



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 113613635 A

(43) 申请公布日 2021. 11. 05

(21) 申请号 202080010616.0

(22) 申请日 2020.01.24

(30) 优先权数据

62/796,534 2019.01.24 US

(85) PCT国际申请进入国家阶段日

2021.07.23

(86) PCT国际申请的申请数据

PCT/US2020/015109 2020.01.24

(87) PCT国际申请的公布数据

W02020/154705 EN 2020.07.30

(71) 申请人 西北大学

地址 美国伊利诺斯

(72) 发明人 S·E·寒里驰 C·S·泰克斯丹

S·T·钮银 洪凤振

(74) 专利代理机构 中国贸促会专利商标事务所

有限公司 11038

代理人 李程达

(51) Int.Cl.

A61K 9/51 (2006.01)

C07K 19/00 (2006.01)

A61K 9/127 (2006.01)

A61K 9/20 (2006.01)

A61K 47/69 (2006.01)

C07K 14/775 (2006.01)

权利要求书3页 说明书26页

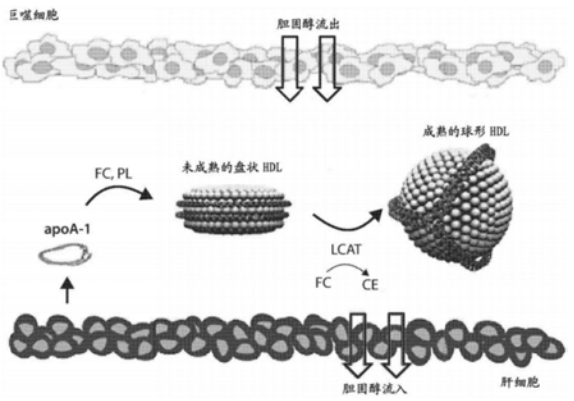
序列表1页 附图19页

(54) 发明名称

使用脂质缀合的核心支架的高密度脂蛋白
模拟纳米颗粒

(57) 摘要

本文公开了具有软材料核心(例如,脂质缀合的无机核心)的球形高密度脂蛋白样纳米颗粒(HDL-NP)。本文还公开了合成球形HDL-NP的方法。本文还公开了使用球形HDL-NP治疗病症例如心血管疾病、癌症、炎症病症或降低NF- κ B活性的方法。



1. 一种球形高密度脂蛋白纳米颗粒 (HDL-NP), 其包含: 核心和围绕并附着于核心的壳, 其中核心包含脂质缀合的有机核心支架。
2. 权利要求1的球形HDL-NP, 其中所述壳是脂质壳。
3. 权利要求1-2中任一项的球形HDL-NP, 其中所述壳是脂质双层或单层。
4. 权利要求1-3中任一项的球形HDL-NP, 其中所述球形HDL-NP具有约-20毫伏 (mV) 的表面zeta电位。
5. 权利要求1-4中任一项的球形HDL-NP, 其中所述有机核心支架包含疏水性小分子-磷脂缀合物 (PL₄)。
6. 权利要求5的球形HDL-NP, 其中所述PL₄包含头基修饰的磷脂。
7. 权利要求6的球形HDL-NP, 其中所述头基修饰的磷脂包括环张力的炔烃、1,2-二棕榈酰基-sn-甘油-3-磷酸乙醇胺-N-二苯并环辛基。
8. 权利要求6-7中任一项的球形HDL-NP, 其中所述磷脂与具有多个末端官能团的小分子偶联。
9. 权利要求8的球形HDL-NP, 其中所述小分子是四 (4-叠氮苯基) 甲烷。
10. 权利要求8或9的球形HDL-NP, 其中所述多个官能团是2-6个官能团。
11. 权利要求8或9的球形HDL-NP, 其中所述多个官能团是4个官能团。
12. 权利要求8-11中任一项的球形HDL-NP, 其中所述官能团是末端叠氮化物 (SM-Az)。
13. 权利要求1-4中任一项的球形HDL-NP, 其中所述有机核心支架包含两亲性DNA连接的小分子-磷脂缀合物 (DNA-PL₄)。
14. 权利要求13的球形HDL-NP, 其中所述DNA是长度为5-17个核苷酸的双链寡核苷酸。
15. 权利要求13的球形HDL-NP, 其中所述DNA是长度为8-15个核苷酸的双链寡核苷酸。
16. 权利要求13的球形HDL-NP, 其中所述DNA是长度为9个核苷酸的双链寡核苷酸。
17. 权利要求13-16中任一项的球形HDL-NP, 其中双链DNA的第一单链与磷脂连接并形成ssDNA-磷脂缀合物 (ssDNA-PL)。
18. 权利要求17的球形HDL-NP, 其中与双链DNA的第一链互补的双链DNA的第二链与小分子连接。
19. 权利要求18的球形HDL-NP, 其中所述小分子是四面体小分子并且与所述DNA连接的小分子形成四面体小分子-DNA杂合体 (SMDH₄)。
20. 权利要求19的球形HDL-NP, 其中所述SMDH₄通过DNA的互补单链之间的氢键连接至ssDNA-PL。
21. 权利要求1-20中任一项的球形HDL-NP, 其中所述球形HDL-NP具有约5-30nm、5-20nm、5-15nm、5-10nm、8-13nm、8-12nm或10nm的直径。
22. 权利要求1-21中任一项的球形HDL-NP, 其中与具有金核心的合成HDL纳米颗粒相比, 所述球形HDL-NP具有更接近人HDL的zeta电位。
23. 权利要求22的球形HDL-NP, 其中所述zeta电位为-16至-26mV。
24. 权利要求1-23中任一项的球形HDL-NP, 其中所述球形HDL-NP具有比载脂蛋白或具有金核心的合成HDL纳米颗粒更有效的胆固醇转运能力。
25. 权利要求1-24中任一项的球形HDL-NP, 还包含载脂蛋白。
26. 权利要求1-25中任一项的球形HDL-NP, 还包含载脂蛋白A-I (ApoA1)。

27. 权利要求1-26中任一项的球形HDL-NP, 其中所述HDL-NP具有大于8.7nm的流体动力学直径。

28. 权利要求1-27中任一项的球形HDL-NP, 其中所述HDL-NP具有8.7nm-17.7nm的流体动力学直径。

29. 权利要求1-28中任一项的球形HDL-NP, 其中所述HDL-NP具有10nm-15nm的流体动力学直径。

30. 权利要求1-29中任一项的球形HDL-NP, 其中所述HDL-NP具有12nm-14nm的流体动力学直径。

31. 权利要求1-30中任一项的球形HDL-NP, 还包含与所述HDL-NP连接的治疗剂。

32. 权利要求31的球形HDL-NP, 其中所述治疗剂是治疗性核酸。

33. 权利要求31的球形HDL-NP, 其中所述治疗剂是抗癌剂。

34. 权利要求33的球形HDL-NP, 其中所述抗癌剂是化学治疗剂。

35. 权利要求31的球形HDL-NP, 其中所述治疗剂是抗炎剂。

36. 一种药物组合物, 其包含权利要求1-35中任一项的球形HDL-NP。

37. 一种治疗癌症的方法, 所述方法包括:

向患有癌症的受试者施用球形高密度脂蛋白纳米颗粒 (HDL-NP), 其包含: 核心和围绕并附着于核心的壳, 其中核心包含有效量的脂质缀合的有机核心支架以治疗癌症。

38. 一种治疗炎性病症的方法, 包括,

向患有炎性病症的受试者施用球形高密度脂蛋白纳米颗粒 (HDL-NP), 其包含: 核心和围绕并附着于核心的壳, 其中核心包含有效量的脂质缀合的有机核心支架以治疗炎性病症。

39. 权利要求37或38的方法, 其中所述球形HDL-NP是权利要求1-35中任一项的球形HDL-NP。

40. 权利要求37-39中任一项的方法, 其中所述受试者是哺乳动物。

41. 权利要求40的方法, 其中所述受试者是人。

42. 一种降低NF- κ B活性的方法, 包括向受试者施用有效量的包含权利要求1-35中任一项的球形HDL-NP的组合物。

43. 一种制备球形高密度脂蛋白纳米颗粒 (HDL-NP) 的方法, 包括: 制备ssDNA-磷脂缀合物 (ssDNA-PL), 制备四面体小分子-DNA杂合体 (SMDH₄), 其中ssDNA-PL和SMDH₄具有互补的DNA序列, 孵育ssDNA-PL和SMDH₄, 使得互补DNA序列彼此碱基配对以形成DNA-PL核心, 并将磷脂脂质体和载脂蛋白添加至DNA-PL核心以产生球形HDL-NP。

44. 权利要求43的方法, 其中所述ssDNA-PL包含至少9个核苷酸的寡核苷酸。

45. 权利要求44的方法, 其中所述寡核苷酸的长度为9个核苷酸。

46. 权利要求45的方法, 其中所述寡核苷酸包含SEQ ID NO:1。

47. 权利要求43的方法, 其中所述SMDH₄包含至少9个核苷酸的寡核苷酸。

48. 权利要求47的方法, 其中所述寡核苷酸的长度为9个核苷酸。

49. 权利要求48的方法, 其中所述寡核苷酸包含SEQ ID NO:3。

50. 权利要求43-49中任一项的方法, 其中所述载脂蛋白是载脂蛋白A-I。

51. 一种有机核心支架, 其包含: 与具有四个末端叠氮化物的四面体小分子核心 (四 (4-

叠氮苯基) 甲烷) 连接的1,2-二棕榈酰基-sn-甘油-3-磷酸乙醇胺-N-二苯并环辛基 (DBCO PE)。

使用脂质缀合的核心支架的高密度脂蛋白模拟纳米颗粒

[0001] 政府支持

[0002] 本发明是在由空军科学研究办公室 (AFOSR) 授予的合同号FA9550-13-1-0192和由国立卫生研究院授予的基金号AG062999下由政府支持完成的。政府对本发明享有一定的权利。

[0003] 相关申请

[0004] 本申请根据35U.S.C.§119(e) 要求2019年1月24日提交的美国临时申请系列号62/796534的优先权,其全部内容通过引用并入本文。

[0005] 发明背景

[0006] 纳米颗粒处于亚微米尺寸范围内,并具有独特的尺寸依赖性特性,使得该材料与其块状形式相比更优越。与纳米颗粒相关的先进化学和物理特性使其在生物学和医学领域得到广泛应用。高密度脂蛋白 (HDL) 是在血液中循环的动态纳米颗粒。

[0007] 发明概述

[0008] 本公开内容呈现了具有与成熟人HDL一致的尺寸、形状、表面化学、组成、蛋白质结构和胆固醇转运特性的软核心、HDL样纳米颗粒的合成。脂质缀合 (LC) 的HDL NP靶向相关细胞类型以去除和递送细胞胆固醇并减少炎症,从而重现人HDL的显著功能。由于LC HDL NP的合成很简单并且不需要耗时且昂贵的酶促成熟步骤,因此预计这些纳米颗粒将被证明是下一代基于HDL的疗法的有力候选者。

[0009] 此外,本公开内容提供了使用脂质缀合的有机核心支架合成和表征球形HDL模拟物的方法。核心设计基序约束和定向磷脂几何结构以促进软核心纳米颗粒的组装,在一些实施方案中,软核心纳米颗粒的直径大约为10nm,并且在它们的大小、形状、表面化学、组成和蛋白质二级结构方面类似于人HDL。

[0010] 在一些方面,本公开内容提供了一种球形高密度脂蛋白纳米颗粒 (HDL-NP),其包含:核心和围绕并附着于核心的壳,其中核心包含脂质缀合的有机核心支架。在一些实施方案中,壳是脂质壳。在一些实施方案中,壳是脂双层或单层。在一些实施方案中,球形HDL-NP具有约-20mV的zeta电位。在一些实施方案中,有机核心支架包含 PL_4 。在一些实施方案中,有机核心支架包含9-DNA- PL_4 。在一些实施方案中,有机核心支架包含18-DNA- PL_4 。在一些实施方案中,与具有无机核心的合成HDL纳米颗粒相比,壳具有更接近人HDL的zeta电位。在一些实施方案中,与具有金核心的合成HDL纳米颗粒相比,球形HDL-NP具有更接近人HDL的zeta电位。在一些实施方案中,球形HDL-NP具有载脂蛋白。在一些实施方案中,载脂蛋白是载脂蛋白A-I。

[0011] 在一些方面,本公开内容提供了包含上述任何一种球形HDL-NP的组合物。

[0012] 在一些方面,本公开内容提供了一种治疗炎症病症的方法,包括向受试者施用有效量的包含上述任何一种球形HDL-NP的组合物。

[0013] 在一些方面,本公开内容提供降低NF- κ B活性的方法,包括向受试者施用有效量的包含上述球形HDL-NP中的任一种的组合物。

[0014] 本发明的一个或多个实施方案的细节在以下描述中阐述。本发明的其他特征或优

点将从以下附图和几个实施方案的详细描述以及从所附权利要求中变得明显。

[0015] 在一个方面,本公开内容涉及球形高密度脂蛋白纳米颗粒(HDL-NP),其包含核心和围绕并附着于核心的壳,其中核心包含脂质缀合的有机核心支架。

[0016] 在一些实施方案中,壳是脂质壳。在一些实施方案中,壳是脂双层或单层。在一些实施方案中,壳是脂质双层。在一些实施方案中,壳是脂质单层。

[0017] 在一些实施方案中,球形HDL-NP具有约-20毫伏(mV)的表面zeta电位。

[0018] 在一些实施方案中,有机核心支架包含 PL_4 。在一些实施方案中,有机核心支架包含9-DNA- PL_4 。在一些实施方案中,有机核心支架包含18-DNA- PL_4 。

[0019] 在一些实施方案中,与具有无机核心的合成HDL纳米颗粒相比,壳具有更接近人HDL的zeta电位。在一些实施方案中,与具有金核心的合成HDL纳米颗粒相比,球形HDL-NP具有更接近人HDL的zeta电位。在一些实施方案中,球形HDL-NP具有-16-26mV的zeta电位。

[0020] 在一些实施方案中,本公开内容的球形HDL-NP进一步包含载脂蛋白。在一些实施方案中,载脂蛋白是载脂蛋白A-I。

[0021] 在一些实施方案中,本公开内容的球形HDL-NP包括大于8.7nm的流体动力学直径。在一些实施方案中,流体动力学直径为8.7nm-17.7nm。在一些实施方案中,流体动力学直径为10nm-15nm。在一些实施方案中,流体动力学直径为12nm-14nm。

[0022] 在一些实施方案中,有机核心支架包含疏水性小分子-磷脂缀合物(PL_4)。在一些实施方案中, PL_4 包含头基修饰的磷脂。在一些实施方案中,头基修饰的磷脂包括环张力的炔烃、1,2-二棕榈酰基-sn-甘油-3-磷酸乙醇胺-N-二苯并环辛基。在一些实施方案中,磷脂与具有多个末端官能团的小分子偶联。在一些实施方案中,小分子是四(4-叠氮苯基)甲烷。在一些实施方案中,多个官能团是2-6个官能团。在一些实施方案中,多个官能团是4个官能团。在一些实施方案中,官能团是末端叠氮化物(SM-Az)。

[0023] 在其他实施方案中,有机核心支架包含两亲性DNA连接的小分子-磷脂缀合物(DNA- PL_4)。在一些实施方案中,DNA是长度为5-17个核苷酸的双链寡核苷酸。在一些实施方案中,DNA是长度为8-15个核苷酸的双链寡核苷酸。在一些实施方案中,DNA是长度为9个核苷酸的双链寡核苷酸。在一些实施方案中,双链DNA的第一单链与磷脂连接并形成ssDNA-磷脂缀合物(ssDNA-PL)。在一些实施方案中,与双链DNA的第一链互补的双链DNA的第二链与小分子连接。在一些实施方案中,小分子是四面体小分子并且与DNA连接的小分子形成四面体小分子-DNA杂合体(SMDH₄)。在一些实施方案中,SMDH₄通过DNA的互补单链之间的氢键连接到ssDNA-PL。

[0024] 在一些实施方案中,球形HDL-NP具有比载脂蛋白或具有金核心的合成HDL纳米颗粒更有效的胆固醇转运能力。

[0025] 在一些实施方案中,球形HDL-NP具有约5-30nm、5-25nm、5-22nm、5-20nm、5-15nm、5-14nm、5-13nm、5-12nm、5-11nm、5-10nm、8-15nm、8-14nm、8-13nm、8-12nm、8-11nm、8-10nm、10-12nm或10nm的直径。

[0026] 在一些实施方案中,球形HDL-NP进一步包含与HDL-NP连接的治疗剂。在一些实施方案中,治疗剂是治疗性核酸。在一些实施方案中,治疗剂是抗癌剂。在一些实施方案中,抗癌剂是化疗剂。在一些实施方案中,治疗剂是抗炎剂。

[0027] 在其他方面,本发明是一种治疗癌症的方法,包括向患有癌症的受试者施用球形

高密度脂蛋白纳米颗粒 (HDL-NP), 其包含: 核心和围绕核心并附着于核心的壳, 其中核心包含有效量的脂质缀合的有机核心支架以治疗癌症。

[0028] 在其他方面, 提供了一种通过向患有炎症病症的受试者施用球形高密度脂蛋白纳米颗粒 (HDL-NP) 来治疗炎症病症的方法, 所述球形高密度脂蛋白纳米颗粒包含: 核心和围绕并附着于核心的壳, 其中核心包含有效量的脂质缀合的有机核心支架以治疗炎症病症。

[0029] 在一方面, 本公开内容涉及包含本公开内容的任何球形HDL-NP的药物组合物。

[0030] 在一方面, 本公开内容涉及治疗癌症或炎症病症的方法, 包括向受试者施用有效量的包含本公开内容的球形HDL-NP的组合物。

[0031] 在一方面, 本公开内容涉及降低NF- κ B活性的方法, 包括向受试者施用有效量的包含本公开内容的任何球形HDL-NP的组合物。

[0032] 在一个方面, 本公开内容涉及一种制备球形高密度脂蛋白纳米颗粒 (HDL-NP) 的方法, 包括制备单链DNA-磷脂缀合物 (ssDNA-PL), 制备四面体小分子-DNA杂合体 (SMDH₄)、其中ssDNA-PL和SMDH₄具有互补的DNA序列, 孵育ssDNA-PL和SMDH₄, 使得互补DNA序列彼此碱基配对以形成DNA-PL核心, 并将磷脂脂质体和载脂蛋白添加至DNA-PL核心以产生球形HDL-NP。

[0033] 在一些实施方案中, ssDNA-PL包含至少9个核苷酸的寡核苷酸。在一些实施方案中, 寡核苷酸的长度为6-16个核苷酸。在一些实施方案中, 寡核苷酸包含SEQ ID NO:1。在一些实施方案中, 寡核苷酸的长度为18个核苷酸。在一些实施方案中, 寡核苷酸包含SEQ ID NO:2。

[0034] 在一些实施方案中, SMDH₄包含至少9个核苷酸的寡核苷酸。在一些实施方案中, 寡核苷酸的长度为9-15个核苷酸。在一些实施方案中, 寡核苷酸包含SEQ ID NO:3。在一些实施方案中, 寡核苷酸的长度为18个核苷酸。在一些实施方案中, 寡核苷酸包含SEQ ID NO:4。

[0035] 在一些实施方案中, 本文公开的任何方法的载脂蛋白是载脂蛋白A-I。

[0036] 在一个方面, 本公开内容涉及一种有机核心支架, 其包含: 与具有四个末端叠氮化物的四面体小分子核心 (四 (4-叠氮苯基) 甲烷) 连接的1,2-二棕榈酰基-sn-甘油-3-磷酸乙醇胺-N-二苯并环辛基 (DBCOPE)。

[0037] 本发明的每个限制可以涵盖本发明的各种实施方案。因此, 预期涉及任何一个元素或元素组合的本发明的每个限制都可以包括在本发明的每个方面中。本发明在其应用方面不限于在以下描述中阐述或在附图中示出的构建细节和组分布置。本发明能够实现有其他实施方案并且能够以各种方式被实践或执行。本发明的一个或多个实施方案的细节在所附的详细描述、实施例、权利要求和附图中阐述。本发明的其他特征、目的和优点将从描述和权利要求中而变得明显。

[0038] 附图的简要说明

[0039] 以下附图构成本说明书的一部分, 并被包括在内以进一步展示本公开内容的某些方面, 通过参考这些附图中的一个或多个并结合在此呈现的具体实施方案的详细描述, 可以更好地理解这些方面。为清楚起见, 并非每个组件可以在每个附图中标出。应当理解, 附图中所示的数据决不限制本公开内容的范围。附图中:

[0040] 图1显示了典型的反向胆固醇转运途径。缩写: FC: 游离胆固醇。CE: 胆固醇酯。PL: 磷脂。LCAT: 卵磷脂: 胆固醇酰基转移酶。

[0041] 图2A-2G:图2A-2C显示了PL₄和DNA-PL₄核心支架以及LC HDL NP组装的合成方案。图2D以质量百分比(%)显示了天然和合成HDL的组成。*Au HDL NP组成是根据先前公布的数据集¹⁸报告的。图2E显示了LC HDL NP和人HDL的圆二色光谱。图2F显示了其核心材料不同的天然和合成HDL物质的示意图。图2G显示了在98,000倍放大倍数下DNA-PL₄ HDL NP (9-mer DNA)的TEM成像。比例尺=50nm。

[0042] 图3A-3D:图3A显示从cAMP处理的J774巨噬细胞的LC HDL NP流出H³-cho1。图3B显示了来自串联流出-流入测定的所有级分中H³-cho1的定量。图3C显示了串联测定中胆固醇流入肝细胞的百分比(%)。图3D显示了SR-B1依赖性胆固醇流出。使用双尾学生t检验确定统计显著性。**p<0.01。***p<0.001。

[0043] 图4:通过流式细胞术(图4A-4B)和共聚焦显微术(图4C),LC HDL NP促进荧光胆固醇(NBD-cho1)在30分钟内快速递送至肝细胞(HepG2)。使用双尾学生t检验确定统计显著性。*p<0.05。***p<0.001。

[0044] 图5A-5B:图5A显示了在LCAT胆固醇酯化测定中游离胆固醇(FC)和胆固醇酯(CE)的定量。图5B显示了促炎性NF-κB信号传导的LC HDL NP介导的抑制。使用双尾学生t检验确定统计显著性。*p<0.05。***p<0.01。

[0045] 图6显示了来自四(4-叠氮苯基)甲烷与CPG上炔官能化的9-mer DNA的偶联反应的9-SMDH₄(SEQ ID NO:1)的分析性RP-HPLC迹线。轨迹是来自设置为260nm的二极管检测器的信号。插图显示纯产品的MALDI-ToF光谱:m/z=12,144(理论值12,144.1)。

[0046] 图7显示了来自四(4-叠氮苯基)甲烷与CPG上炔官能化的18-mer DNA的偶联反应的18-SMDH₄(SEQ ID NO:2)的分析性RP-HPLC迹线。轨迹是来自设置为260nm的二极管检测器的信号。插图显示纯产品的MALDI-ToF光谱:m/z=23,264(理论值23,263.7)。

[0047] 图8显示了粗9-DNA-脂质(SEQ ID NO:3)的半制备型RP-HPLC迹线。轨迹是来自设置为260nm的二极管检测器的信号。33-42分钟的纯9-DNA-脂质(SEQ ID NO:3)通过MALDI-ToF(插图)分离和鉴定:m/z=3,340(理论值3,342.4)。

[0048] 图9显示粗18-DNA-脂质(SEQ ID NO:4)的半制备型RP-HPLC迹线。轨迹是来自设置为260nm的二极管检测器的信号。38-45分钟的纯18-DNA-脂质(SEQ ID NO:4)通过MALDI-ToF(插图)分离和鉴定:m/z=6,115(理论值6,118.2)。

[0049] 图10显示了9-SMDH₄(SEQ ID NO:1)和18-SMDH₄(SEQ ID NO:2)和9-DNA-脂质(SEQ ID NO:3)缀合物和18-DNA-脂质(SEQ ID NO:4)缀合物的变性PAGE-凝胶图像(15%,7M尿素)。凝胶实验在1×TBE缓冲液中以180V进行1小时,然后用SYBR Gold(Thermo Fisher Scientific, Inc., Grand Island, NY)对凝胶进行染色,并使用Typhoon 9400(GE Healthcare, Pittsburgh, PA)采集其图像。

[0050] 图11:PL₄合成方案。PL₄核心材料通过1,2-二棕榈酰基-sn-甘油-3-磷酸乙醇胺-N-二苯环辛基(DBCO PE)与具有四个末端叠氮化物的四面体小分子核心(四(4-叠氮苯基)甲烷)的无铜点击化学缀合来合成(图11)。在典型的反应中,DBCO PE和四(4-叠氮苯基)甲烷各自以0.1wt%溶解在N,N-二甲基甲酰胺(DMF, Sigma Aldrich)中,并以DMF中的DBCO PE与四(4-叠氮苯基)甲烷的10:1的摩尔比混合。将反应混合物进行三轮交替涡旋和水浴超声处理,然后允许在涡旋下在室温反应24小时。然后使用HPLC和电喷雾电离质谱(图12)表征所得反应混合物。由于图12仅显示了PL₄的正确质量的单一类型,我们得出结论,没有部分偶

联的产物(PL₃、PL₂等),并且使用反应混合物用于组装步骤。由于组装步骤涉及添加大量过量的DPPC脂质,因此在用于组装之前无需将过量的DBC0 PE分子与PL₄核心分离。

[0051] 图12显示PL₄核心的电喷雾电离质谱。产品 $m/z=4401.6$ (理论值:4401.7)。

[0052] 图13显示了通过负染色TEM的PL₄ HDL NP的超微结构表征。使用FEI Tecnai Spirit TEM进行成像。插图(最右侧的图)是120,000倍放大的图。每个图像上标记的比例尺,从50-200nm。通过使用ImageJ软件测量>50个颗粒,将TEM直径确定为 $10\pm 2\text{nm}$ 。

[0053] 图14显示了使用18-mer DNA-PL₄支架的组装尝试的超微结构表征。

[0054] 图15显示核心+DPPC、无apoA-1的TEM成像(顶行:DNA-PL₄核心+DPPC;底行:PL₄核心+DPPC)。注意:与含蛋白质的样品(20秒染色)相比,不含蛋白质的Core+DPPC对照样品的充分可视化需要更长的时间的乙酸双氧铀染色(15分钟染色)。

[0055] 图16:LC HDL NP组装和apoA-1寡聚化特征谱的表征。apoA-1在与PL₄和DNA-PL₄颗粒的脂质缀合物核心支架组装后采用更高阶的寡聚化状态。

[0056] 发明详述

[0057] 高密度脂蛋白(HDL)是天然循环纳米颗粒,其携带胆固醇、靶向特定细胞类型并在许多疾病过程中发挥重要作用。因此,合成的HDL模拟物已成为有前途的治疗剂。然而,迄今为止的方法无法重现球形HDL的关键特征,球形HDL是最丰富的HDL种类,并且具有特别的临床重要性。

[0058] 天然HDL是循环纳米颗粒(直径约8-13nm),其运输胆固醇并在癌症和心血管疾病中发挥重要作用。球形HDL是最丰富的HDL亚种,并且在临床上特别重要。然而,以前的HDL模拟物无法在不依赖无机模板材料(例如金纳米颗粒)的情况下重现球形HDL的特征(例如球形HDL构象)。在本文,意外地发现球形HDL构象可以在具有脂质缀合的有机核心支架的HDL样纳米颗粒中实现。本公开内容的这些HDL样纳米颗粒是它们的种类的第一种,即具有软材料核心的球形HDL模拟物。

[0059] 本公开内容的HDL样纳米颗粒使用新型脂质偶联的有机核心支架模拟球形HDL种类。核心设计基序约束和定向磷脂几何结构以促进软核心纳米颗粒的组装,在一些实施方案中,软核心纳米颗粒的直径大约为10nm,并且在它们的大小、形状、表面化学、组成和蛋白质二级结构方面类似于人HDL。HDL样纳米颗粒在大小($\sim 10\text{nm}$)、表面化学(-20mV zeta电位)和由圆二色谱确定的HDL蛋白质二级结构方面模拟天然HDL的结构。合成的HDL已证明有望用于心血管疾病和癌症以及其他适应症的疗法。概括HDL显著功能所需的合成HDL模拟物的两个主要特征是1)软材料核心,和2)球形构象。本公开内容的HDL样纳米颗粒被设计成与之前的合成平台(其均没有再现上述两个特征)相比能够实现卓越的治疗功效。

[0060] 高密度脂蛋白(HDL)是动态纳米颗粒,其在血液中循环并运输胆固醇。临床上,升高的HDL胆固醇水平与动脉粥样硬化心血管疾病(ASCVD)的风险降低有关¹⁻²。在细胞水平上,HDL分别靶向巨噬细胞和肝细胞以去除和输送胆固醇,这已被显示减少炎症和动脉粥样硬化负担³⁻⁴。由于HDL和ASCVD之间的有益关联、细胞特异性靶向特性以及使用HDL进行靶向药物递送的意图,大量的努力集中在合成类似于其天然对应物的HDL⁵。

[0061] 血液中有多种HDL种类可用作合成靶标。未成熟的HDL缺乏胆固醇且呈盘状,主要由HDL定义蛋白、载脂蛋白A-I(在本文中可称为apoA-I、apoA-1和/或载脂蛋白A-1)和磷脂组成。HDL的成熟形式(也含有apoA-I和磷脂的表层)富含胆固醇和胆固醇酯,并呈现更多的

球形(图1)。球形HDL占循环中的大部分HDL⁶⁻⁷。然而,用作疗法的合成形式的HDL仅与未成熟的盘状HDL相似⁸。这主要是因为这些重组形式的HDL(rHDL)相对容易通过自身组装磷脂和apoA-I来制备⁸⁻¹²。使用rHDL的临床试验显示出一些前景,但表明在制造更强力 and 有效的合成HDL方面还有很大的改进空间¹⁰⁻¹²。

[0062] 球形HDL种类与ASCVD减少最相关¹³。然而,由于将盘状HDL成熟为含有胆固醇和胆固醇酯的球形HDL所需的酶促步骤,这些HDL更难以合成。以前的研究试图通过使用无机纳米颗粒作为模板来规避这些生物成熟步骤¹⁴⁻¹⁶。模板可以用磷脂和apoA-I进行官能化,并成功地将HDL模拟物的大小限制为<15nm直径¹⁷。然而,这些材料无法概括天然球形HDL的关键特征,即能够动态加载和卸载胆固醇和胆固醇酯的强健的软材料核心。除了无机模板材料外,还使用两亲性肽合成了软核心盘状HDL样颗粒²²。

[0063] 在本文中,使用脂质缀合的核心支架(LC HDL NP)合成HDL模拟纳米颗粒是在两步过程中完成的:首先,合成和纯化核心支架;其次,颗粒通过核心支架、游离磷脂和HDL定义蛋白载脂蛋白A1(apo-A1)的超分子组装制造。理论上可以使用多种脂质缀合的有机核心进行颗粒组装。在此,展示了使用三种不同的有机核心支架成功制造颗粒。具体而言,使用了两种不同长度的四面体小分子-磷脂杂合体(称为PL₄)和四面体ssDNA-磷脂-小分子杂合体(称为DNA-PL₄)。

[0064] 本公开内容提供使用脂质缀合的核心支架(LC HDL NP)合成具有成熟人HDL的结构和功能特性的球形HDL样纳米颗粒的方法。研究了大小和组成不同但具有相同四面体几何形状的三个有机支架。第一个支架是使用无铜点击化学合成的高度疏水的小分子-磷脂缀合物(PL₄)。具体来说,含有环张力的炔烃、1,2-二棕榈酰-sn-甘油-3-磷酸乙醇胺-N-二苯并环辛基的头部基团修饰的磷脂被点击偶联到四(4-叠氮苯基)甲烷,其是一种小的具有四个末端叠氮化物(SM-Az4)的分子(图2A和图11-12)。与PL₄核心相反,第二个(9-DNA-PL₄)和第三个(18-DNA-PL₄)核心支架是两亲性DNA连接的PL₄核心(图2B),具有不同的DNA接头长度(9-mer相对18-mer dsDNA)。虽然亲水性DNA接头提高了核心在水溶液中的溶解度,但朝向外部的磷脂尾基能够与apoA-1和磷脂进行疏水相互作用。通过加入不同长度的DNA接头,可以轻松调整这些核心的大小。DNA-PL₄核心以两步方式合成(参见本文的合成部分)。首先,合成DNA-磷脂缀合物(ssDNA-PL)和四面体小分子-DNA杂合体(SMDH₄) (表2)。其次,将具有互补碱基配对序列的ssDNA-PL和SMDH₄杂交以产生最终的DNA-PL₄核心(图2B和图6-9)。

[0065] 新生HDL成熟为球形HDL的机制是通过支持游离胆固醇的酶促酯化,这是一种由酶卵磷脂:胆固醇酰基转移酶(LCAT)在血液中进行反应。在本文中,发现PL₄和DNA-PL₄ HDL NP都能够支持LCAT介导的酯化(图5A)。然而,PL₄ HDL NP表现出比Au HDL NP和DNA-PL₄ HDL NP显著更大的酯化能力,将87%的结合的胆固醇转化为胆固醇酯。这一结果可能是由于PL₄核心相对于金(Au)和DNA-PL₄核心具有增加的灵活性和疏水性,从而能够有效地填充胆固醇酯。

[0066] 如本文所用,术语“HDL样”、“HDL类似的”和“HDL模拟物”可互换使用以指代合成的HDL-NP。

[0067] 在一些方面,本公开内容提供了一种球形高密度脂蛋白纳米颗粒(HDL-NP),其包含:核心和围绕并附着于核心的壳,其中核心包含脂质缀合的有机核心支架。壳可以是脂质壳,其在一个或多个点连接到有机核心支架的组分,如图1示意性所示的。在一些实施方案

中,壳是脂质双层或单层。

[0068] 在一组实施方案中,本文所述的结构或其一部分(例如结构的壳)包含一种或多种天然或合成脂质或脂质类似物(即,亲脂性分子)。一种或多种脂质和/或脂质类似物可以形成单层或多层(例如,双层)结构。在形成多层的一些情况下,天然或合成脂质或脂质类似物相互交错(例如,在不同层之间)。天然或合成脂质或脂质类似物的非限制性实例包括脂肪酰基、甘油酯、甘油磷脂、鞘脂、糖脂和聚酮化合物(源自酮酰基亚基的缩合),以及固醇脂质和异戊烯醇脂质(源自异戊二烯亚基的缩合)。

[0069] 在一组特定的实施方案中,本文所述的结构包括一种或多种磷脂。一种或多种磷脂可以包括例如磷脂酰胆碱、磷脂酰甘油、卵磷脂、 β , γ -二棕榈酰- α -卵磷脂、鞘磷脂、磷脂酰丝氨酸、磷脂酸、N-(2,3-二(9-(Z)-十八烯氧基))-丙-1-基-N,N,N-三甲基氯化铵,磷脂酰乙醇胺,溶血卵磷脂,溶血磷脂酰乙醇胺,磷脂酰肌醇,脑磷脂,心磷脂,脑苷脂,双十六烷基磷酸,二油酰基磷脂酰胆碱,二棕榈酰磷脂酰胆碱,二棕榈酰磷脂酰甘油,二油酰基磷脂酰甘油,棕榈酰-油酰-磷脂酰胆碱,二-硬脂酰-磷脂酰胆碱,硬脂酰-棕榈酰-磷脂酰胆碱,二-棕榈酰-磷脂酰乙醇胺,二-硬脂酰-磷脂酰乙醇胺,二-肉豆蔻酰-磷脂酰丝氨酸,二-油酰-磷脂酰胆碱,1,2-二棕榈酰-sn-甘油-3-磷酸硫代乙醇及其组合。在一些情况下,结构的壳(例如,双层)包括50-200种天然或合成脂质或脂质类似物(例如,磷脂)。例如,壳可包含少于约500、少于约400、少于约300、少于约200或少于约100种天然或合成脂质或脂质类似物(例如,磷脂),例如,取决于结构的大小。

[0070] 还可以使用不含磷的脂质,例如硬脂胺、十二烷基胺、乙酰棕榈酸酯和脂肪酸酰胺。在其他实施方案中,其他脂质例如脂肪、油、蜡、胆固醇、固醇、脂溶性维生素(例如,维生素A、D、E和K)、甘油酯(例如,甘油单酯、甘油二酯、甘油三酯)可用于形成本文描述的结构的一部分。

[0071] 本文所述的结构的一部分(例如纳米结构的壳或表面)可以任选地包括一个或多个烷基,例如含烷烃、烯烃或炔烃的种类,其任选地赋予结构疏水性。“烷基”是指饱和脂肪族基团,包括直链烷基、支链烷基、环烷基(脂环族)基团、烷基取代的环烷基和环烷基取代的烷基。烷基可以具有各种碳数量,例如在 C_2 至 C_{40} 之间,并且在一些实施方案中可以大于 C_5 、 C_{10} 、 C_{15} 、 C_{20} 、 C_{25} 、 C_{30} 或 C_{35} 。在一些实施方案中,直链或支链烷基在其主链中可具有30个或更少的碳原子,并且在一些情况下,20个或更少。在一些实施方案中,直链或支链烷基在其主链中可具有12个或更少(例如,对于直链 C_1 - C_{12} ,对于支链 C_3 - C_{12})、6个或更少、或4个或更少的碳原子。类似地,环烷基在其环结构中可具有3-10个碳原子,或在环结构中可具有5、6或7个碳原子。烷基的实例包括但不限于甲基、乙基、丙基、异丙基、环丙基、丁基、异丁基、叔丁基、环丁基、己基、环己基等。

[0072] 在一些实施方案中,本公开内容的球形HDL-NP进一步包含载脂蛋白。载脂蛋白可以是载脂蛋白A(例如apo A-I、apo A-II、apo A-IV和apo A-V)、载脂蛋白B(例如apo B48和apo B100)、载脂蛋白C(例如apo C-I、apo C-II、apo C-III和apo C-IV)以及载脂蛋白D、E和H。具体而言,apo A1、apo A2和apo E促进胆固醇和胆固醇酯转移到肝脏以用于代谢,并且可用于包括在本文所述的结构中。另外或可选地,本文所述的结构可包括载脂蛋白的一种或多种肽类似物,例如上文所述的一种。当然,其他蛋白质(例如,非载脂蛋白)也可以包含在本文所述的纳米结构中。在一些实施方案中,载脂蛋白是载脂蛋白A-I。

[0073] HDL-NP具有有机核心支架。如本文所用,有机核心支架是指非金属材料、软核心,具有3维结构和足以组织和保持球形脂质层的电荷。此处的“球形”形状或结构是指具有圆形或球状结构的结构。该结构不需要是完美的圆形或精确的球体,而是近似的球体形状。

[0074] 在一些实施方案中,有机核心支架包含疏水性小分子-磷脂缀合物(PL_4)。疏水性小分子-磷脂缀合物包含任何能够与磷脂连接的小分子。在一些实施方案中,小分子是四(4-叠氮苯基)甲烷。

[0075] 在一些实施方案中,磷脂可以是头基修饰的磷脂。在一些实施方案中,头基修饰的磷脂包含环张力的炔烃、1,2-二棕榈酰基-sn-甘油-3-磷酸乙醇胺-N-二苯并环辛基。

[0076] 小分子可以直接连接到磷脂或可以通过使用官能团连接。官能团可包括可用于将磷脂官能化成小分子的任何合适的端基,例如氨基(例如,未取代或取代的胺)、酰胺基、叠氮化物、亚胺基、羧基基团或硫酸基团。在一些情况下,官能团包括至少第二端基。在其他实施方案中,第二端基是可以共价附着到另一个官能团的反应性基团。在一些实施方案中,磷脂与具有多个末端官能团的小分子偶联。在一些实施方案中,多个官能团是2-6个官能团。在一些实施方案中,多个官能团是4个官能团。在一些实施方案中,官能团是末端叠氮化物(SM-Az)。

[0077] 在其他实施方案中,有机核心支架包含两亲性DNA连接的小分子-磷脂缀合物(DNA- PL_4)。DNA(或任何其他核酸,包括修饰的和天然存在的核酸)在磷脂和小分子之间提供了独特的连接。使用DNA是有利的,因为通过改变DNA链的长度可以容易地控制DNA的大小和因此核心。在一些实施方案中,DNA的长度为5-50个核苷酸。在其他实施方案中,DNA的长度为5-45,5-40,5-35,5-30,5-25,5-20,5-17,5-16,5-15,5-14,5-13,5-12,5-11,5-10,5-9,5-8,5-7,6-45,6-40,6-35,6-30,6-25,6-20,6-17,6-16,6-15,6-14,6-13,6-12,6-11,6-10,6-9,6-8,6-7,7-45,7-40,7-35,7-30,7-25,7-20,7-17,7-16,7-15,7-14,7-13,7-12,7-11,7-10,7-9,7-8,8-45,8-40,8-35,8-30,8-25,8-20,8-17,8-16,8-15,8-14,8-13,8-12,8-11,8-10,8-9,9-45,9-40,9-35,9-30,9-25,9-20,9-17,9-16,9-15,9-14,9-13,9-12,9-11或9-10个核苷酸。

[0078] 在一些实施方案中,DNA是双链寡核苷酸。在一些实施方案中,DNA是长度为8-15个核苷酸的双链寡核苷酸。在一些实施方案中,DNA是长度为9个核苷酸的双链寡核苷酸。

[0079] 在一些实施方案中,双链DNA的第一单链与磷脂连接并形成ssDNA-磷脂缀合物(ssDNA-PL)。在一些实施方案中,与双链DNA的第一链互补的双链DNA的第二链与小分子连接。在一些实施方案中,小分子是四面体小分子并且与DNA连接的小分子形成四面体小分子-DNA杂合体(SMDH₄)。在一些实施方案中,SMDH₄通过DNA的互补单链之间的氢键合连接到ssDNA-PL。

[0080] 在一些实施方案中,球形HDL-NP进一步包含与HDL-NP连接的治疗剂。在一些实施方案中,治疗剂是治疗性核酸。在一些实施方案中,治疗剂是抗癌剂。在一些实施方案中,抗癌剂是化疗剂。在一些实施方案中,治疗剂是抗炎剂。

[0081] 治疗性核酸可包括任何核酸,例如但不限于多核苷酸、DNA序列、编码治疗性蛋白质的DNA序列、RNA序列、小干扰RNA(siRNA)、mRNA、短发夹RNA(shRNA)、微小RNA(miRNA)、反义寡核苷酸、三链DNA、质粒DNA(pDNA)或其任意组合。在一些实施方案中,治疗性核酸可以被处理或化学修饰。例如,治疗性核酸可包含除磷酸二酯键之外的核苷酸间键联,例如硫代

磷酸酯、甲基磷酸酯、甲基磷酸二酯、二硫代磷酸酯、氨基磷酸酯、磷酸三酯或磷酸酯键联，其在一些实施方案中可赋予增加的稳定性。核酸稳定性也可以通过在合成过程中将3'-脱氧胸苷或2'-取代的核苷酸(被例如烷基取代)掺入核酸或通过提供作为苯基异脲衍生物的核酸，或通过具有连接到核酸的3'末端的其他分子例如氨基吡啶或聚赖氨酸来增加。RNA和/或DNA的修饰可以存在于整个寡核苷酸或核酸的选定区域中，例如5'和/或3'末端，例如通过甲基化。

[0082] 在某些实施方案中，抗癌剂是化疗药物，例如紫杉醇、顺铂、卡铂、拓扑替康和多柔比星。

[0083] 在一个方面，本公开内容涉及包含连接至具有2-6个末端叠氮化物的四面体小分子核心(四(4-叠氮苯基)甲烷)的1,2-二棕榈酰基-sn-甘油-3-磷酸乙醇胺-N-二苯并环辛基(DBCO PE)的有机核心支架。在一些实施方案中，该结构具有4个末端叠氮化物。

[0084] 本公开内容的HDL-NP的尺寸、物理性质和功能性质类似于天然存在的HDL-NP的尺寸、物理性质和功能性质并且不同于其他合成HDL-NP。这些特性包括，例如，球形、表面化学、尺寸、流体动力学直径、zeta电位、胆固醇流出、胆固醇递送和治疗功能，例如抑制炎症。

[0085] 在一些实施方案中，本公开内容的球形HDL-NP可以基于流体动力学直径进行评估。球形HDL-NP的流体动力学直径类似于天然存在的HDL-NP的流体动力学直径，并且与其他合成HDL-NP不同。流体动力学直径评估以与被测量的颗粒相同的方式扩散的假设硬球的尺寸，并提供颗粒的扩散特性(其将指示动态水合/溶剂化颗粒的表观尺寸)的指示。它可以通过动态光散射(DLS)来测量。在一些实施方案中，流体动力学直径大于8.7nm。在一些实施方案中，流体动力学直径为8.7nm-17.7nm。在一些实施方案中，流体动力学直径为10nm-15nm。在一些实施方案中，流体动力学直径为12nm-14nm。

[0086] 本公开内容的球形HDL样纳米颗粒可以具有拥有例如小于或等于约500nm、小于或等于约250nm、小于或等于约100nm、小于或等于约75nm、小于或等于约50nm、小于或等于约40nm、小于或等于约35nm、小于或等于约30nm、小于或等于约25nm、小于或等于约20nm、小于或等于约15nm或小于或等于约5nm的最大横截面尺寸(或有时为最小横截面尺寸)的直径。在一些实施方案中，球形HDL-NP具有约5-30nm、5-25nm、5-22nm、5-20nm、5-15nm、5-14nm、5-13nm、5-12nm、5-11nm、5-10nm、8-15nm、8-14nm、8-13nm、8-12nm、8-11nm、8-10nm、10-12nm或10nm的直径。

[0087] 本公开内容的HDL样纳米颗粒可具有拥有例如小于或等于约300nm、小于或等于约250nm、小于或等于约100nm、小于或等于约75nm、小于或等于约50nm、小于或等于约40nm、小于或等于约35nm、小于或等于约30nm、小于或等于约25nm、小于或等于约20nm、小于或等于约15nm或小于或等于约5nm的最大横截面尺寸(或有时，最小横截面尺寸)的核心。在一些情况下，核心具有大于约1:1、大于3:1或大于5:1的纵横比。如本文所用，“纵横比”是指长度或宽度的比率，其中长度和宽度彼此垂直测量，并且长度是指最长的线性测量的尺寸。

[0088] 在一些实施方案中，与具有无机核心的合成HDL纳米颗粒相比，壳具有更接近人HDL的zeta电位。在一些实施方案中，与具有金核心的合成HDL纳米颗粒相比，球形HDL-NP具有更接近人HDL的zeta电位。在一些实施方案中，球形HDL-NP具有-16-26mV的zeta电位。在一些实施方案中，HDL样纳米颗粒的zeta电位为约-20毫伏(mV)。在一些实施方案中，HDL样纳米颗粒的zeta电位选自-10mV、-12mV、-14mV、-16mV、-18mV、-20mV、-22mV、-24mV、-26mV

和-30mV。在一些实施方案中,HDL样纳米颗粒的zeta电位大于-20mV。在一些实施方案中,zeta电位小于-20mV。在一些实施方案中,zeta电位是人HDL的zeta电位。Zeta电位可以使用本领域已知的方法包括本文公开的方法评估。

[0089] 在一些实施方案中,本公开内容的HDL样纳米颗粒不包括基于肽的支架材料。

[0090] 本公开内容的组合物和方法代表了朝着球形HDL的真正合成功能模拟物迈出的重要一步。本公开内容的HDL样纳米颗粒(也称为合成颗粒或合成HDL颗粒或HDL-NP)能够执行显著的HDL功能,包括胆固醇从巨噬细胞(或从载有脂质的巨噬细胞)流出、胆固醇递送至肝细胞,支持卵磷脂:胆固醇酰基转移酶活性和抑制炎症。因此,在一些实施方案中,球形HDL-NP具有比载脂蛋白或具有金核心的合成HDL纳米颗粒更有效的胆固醇转运能力。胆固醇转运能力可以使用体外试验如本文所述的试验来评估。可以相对于胆固醇转运的标准已知值或相对于阴性对照例如具有金核心或APO-A1的合成HDL-NP颗粒或相对于阳性对照例如天然存在的HDL-NP评估胆固醇转运能力。

[0091] 因此,本公开内容的组合物和方法可用于应用,包括但不限于癌症治疗、炎症性疾病、心血管疾病治疗、骨病治疗和免疫疾病治疗。

[0092] 使用合成的HDL作为疗法有很大的前景。本领域之前和正在进行的临床试验表明,重构的HDL可以安全地注射到人中,并且在心血管疾病的情况下显示出边际的临床益处。然而,需要能够发挥更有效作用的合成HDL的新方法。本公开内容的HDL样纳米颗粒(由于它们的新元素,包括球形HDL的软核心模拟物)代表了合成HDL在临床中显著增强的治疗效果的有力候选者。

[0093] 巨噬细胞NF- κ B活性促进的炎症是ASCVD的一个标志,它推动疾病进展并增加发病率和死亡率。在此,为了评估LC HDL NP减轻炎症的能力,在用LC HDL NP或apoA-1对照处理之前,用脂多糖处理人单核细胞报告细胞系(THP1-Dual)以刺激NF- κ B活性。虽然单独的apoA-1没有表现出降低NF- κ B活性的能力,但PL₄ HDL NP和DNA-PL₄ HDL NP都以剂量依赖性方式降低了NF- κ B活性,在150nM的蛋白质浓度下分别降低了31%和16%(图5B)。

[0094] 在一些方面,本发明是一种治疗心血管疾病的方法。心血管疾病是血管内皮细胞功能障碍并开始出现某些症状,包括常规或以上的心脏和血管系统上,动脉粥样硬化、高血压、gojihyeol、冠心病(心脏病发作)、脑血管疾病(中风、痴呆)、外周血管疾病、心律失常、心力衰竭、充血性心脏病、心脏病以及对于至少心脏和血管的名称,包括但不限于此。心血管疾病的一些主要因素包括但不限于遗传因子的表达、生活习惯和糖尿病并发症。

[0095] 动脉粥样硬化是为心肌提供富氧血液的动脉因富含胆固醇的斑块而逐渐变窄的机制。这些斑块随着时间的推移而生长和硬化,从而减少血流量、破裂并导致心脏病发作。支撑冠状动脉和保持冠状动脉开放的干预措施(例如血管成形术和金属支架)非常普遍。这些疗法的一个关键问题是由于血管重塑(称为新内膜增生)而失败,其中平滑肌细胞通过支架生长,从而使血管重新变窄(即再狭窄)。涂有药物以防止细胞生长的药物洗脱支架(DES)通过限制平滑肌细胞的增殖确实减少了血管再狭窄;然而,该药物还抑制天然内衬血管并阻止血块形成的内皮细胞的生长。患者必须继续服用强效药物以防止血凝块,从而使他们容易出现危及生命的出血并发症。

[0096] 本发明在提高血管介入成功率以及减少动脉粥样硬化斑块破裂造成的长期损害方面具有巨大价值。如本文所用,心血管疾病包括但不限于动脉硬化、冠心病、局部缺血、内

皮功能障碍特别是影响血管弹性的功能障碍、再狭窄、血栓形成、心绞痛、高血压、心肌病、高血压性心脏病、心力衰竭、肺源性心脏病、心脏节律不整、心内膜炎、炎性心脏肥大、心肌炎、心肌梗塞、瓣膜性心脏病、中风和脑血管疾病、主动脉瓣狭窄、充血性心力衰竭和外周动脉疾病。

[0097] 在一些实施方案中,本发明的组合物将被诊断患有心血管疾病或处于心血管疾病风险的受试者的心血管参数恢复和/或改善至正常范围。心血管参数的正常范围包括但不限于约65-240mL的舒张末期容积(EDV)、约16-143mL的收缩末期容积(ESV)、约55-100mL的每搏输出量、约55-70%的射血分数、约60-100bpm的心率和/或约4.0-8.0L/min的心输出量。

[0098] 在其他方面,提供了一种通过向患有炎症病症的受试者施用球形高密度脂蛋白纳米颗粒(HDL-NP)来治疗炎症病症的方法,所述球形高密度脂蛋白纳米颗粒包括:核心和围绕并附着于核心的壳,其中核心包含有效量的脂质缀合的有机核心支架以治疗炎症病症。

[0099] 本发明的组合物还可用于治疗炎症疾病。炎症疾病的实例包括但不限于寻常痤疮、哮喘、自身免疫疾病(例如,急性播散性脑脊髓炎(ADEM)、艾迪生病、无丙种球蛋白血症、斑秃、肌萎缩侧索硬化、强直性脊柱炎、抗磷脂综合征、抗合成酶综合征、特异性变态反应、特应性皮炎、自身免疫性再生障碍性贫血、自身免疫性心肌病、自身免疫性肠病、自身免疫性溶血性贫血、自身免疫性肝炎、自身免疫性内耳病、自身免疫性淋巴增生综合征、自身免疫性周围神经病、自身免疫性胰腺炎、自身免疫性多内分泌腺综合征、自身免疫性黄体酮皮炎、自身免疫性血小板减少性紫癜、自身免疫性荨麻疹、自身免疫性葡萄膜炎、Balo同心圆硬化、白塞氏病、伯杰氏病、比克斯塔夫脑炎、Blau综合征、大疱性类天疱疮、卡斯尔曼病、乳糜泻、恰加斯病、慢性炎性脱髓鞘性多发性神经病、慢性复发性多灶性骨髓炎、慢性阻塞性肺病、Churg-Strauss综合征、瘢痕性类天疱疮、Cogan综合征、冷凝集素病、补体成分2缺乏、接触性皮炎、颅动脉炎、CREST综合征、克罗恩病、库欣综合征、皮肤白细胞破碎性血管炎、Dego病、Dercum病、疱疹样皮炎、皮肌炎、1型糖尿病、弥漫性皮肤系统性硬化症、Dressler综合征、药源性狼疮、盘状红斑狼疮、湿疹、子宫内膜异位症、起止点炎相关性关节炎、嗜酸性粒细胞性筋膜炎、嗜酸性粒细胞性肠胃炎、获得性大疱性表皮松解、结节性红斑、胎儿成红细胞增多病、原发性混合性冷球蛋白血症、埃文氏综合征、进行性骨化纤维发育不良、纤维化肺炎、胃炎、胃肠道类天疱疮、巨细胞动脉炎、肾小球肾炎、Goodpasture综合征、格雷夫斯病、Guillain-Barre综合征、桥本脑病、桥本甲状腺炎、Henoch-Schonlein紫癜、妊娠疱疹、化脓性汗腺炎、Hughes-Stovin综合征、低丙种球蛋白血症、特发性炎性脱髓鞘疾病、特发性肺纤维化、特发性血小板减少性紫癜、IgA肾病、包涵体肌炎、慢性炎性脱髓鞘性多发性神经病、间质性膀胱炎、幼年特发性关节炎、川崎病、Lambert-Eaton肌无力综合征、白细胞碎裂性血管炎、扁平苔藓、硬化性苔藓、线状IgA病、红斑狼疮、Majeed综合征、Meniere'综合征、显微镜下多血管炎、混合性结缔组织病、硬斑病、Mucha-Habermann病、重症肌无力、肌炎、发作性睡病、视神经脊髓炎、神经性肌强直、眼瘢痕性类天疱疮、眼阵挛性肌阵挛综合征、Orbicular肌炎、复发性风湿病、PANDAS、副肿瘤性小脑变性、阵发性睡眠性血红蛋白尿症、Parry Romberg综合征、Parsonage-Turner综合征、睫状体扁平部炎、寻常型天疱疮、恶性贫血、静脉周围脑脊髓炎、POEMS综合征、结节性多动脉炎、风湿性多肌痛、多肌炎、原发性胆汁性肝硬化、原发性硬化性胆管炎、进行性炎性神经病、银屑病关节炎、坏疽性脓皮病、纯红细胞再

生障碍、Rasmussen脑炎、雷诺现象、复发性多软骨炎、赖特氏综合征、不宁腿综合征、腹膜后纤维化、风湿热、施尼茨勒综合征、巩膜炎、硬皮病、血清病、Sjogren综合征、脊柱关节病、僵人综合征、亚急性细菌性心内膜炎、Susac综合征、Sweet综合征、交感神经性眼炎、Takayasu动脉炎、颞动脉炎、血小板减少症、Tolosa-Hunt综合征、横贯性脊髓炎、溃疡性结肠炎、未分化结缔组织病、未分化脊柱关节病、白癜风和韦格纳氏肉芽肿病)、乳糜泻、慢性前列腺炎、肾小球肾炎、过敏症、炎性肠病、盆腔炎、再灌注损伤、类风湿性关节炎、结节病、移植排斥、血管炎、间质性膀胱炎和骨关节炎。

[0100] 在其他方面,本发明是一种治疗癌症的方法,包括向患有癌症的受试者施用球形高密度脂蛋白纳米颗粒(HDL-NP),其包含:核心和围绕核心并附着于核心的壳,其中核心包含有效量的脂质缀合的有机核心支架以治疗癌症。

[0101] 可以使用本发明的组合物治疗的其他病况包括癌症。癌症的特征通常是不受调节的细胞生长、恶性肿瘤的形成以及对身体的附近部位的侵袭。癌症也可能通过淋巴系统或血液扩散到身体更远的部位。癌症可能是由于烟草使用、某些感染、辐射、缺乏体力活动、肥胖和/或环境污染引起的基因损伤的结果。癌症也可能是由于遗传性遗传而在细胞内存在遗传缺陷以导致疾病的结果。筛查可用于在出现任何明显症状之前发现癌症,并且可以对处于发展癌症的较高风险的人(例如,有癌症家族史的人)进行治疗。癌症的筛查技术的例子包括但不限于身体检查、血液或尿液检测、医学成像和/或基因测试。癌症的非限制性实例包括:膀胱癌、乳腺癌、结直肠癌、子宫内膜癌、肾或肾细胞癌、白血病、肺癌、黑色素瘤、非霍奇金淋巴瘤、胰腺癌、前列腺癌、卵巢癌、胃癌、消耗性疾病和甲状腺癌。

[0102] 在一些实施方案中,本文所述的纳米结构可用于治疗表达或过表达I型B类清道夫受体(SR-BI)的癌症。表达或过表达SR-BI的癌症的非限制性实例包括人前列腺癌、乳腺癌和肾细胞癌。Rajora等人Front Pharmacol. (2016) 7:326中列出了过表达SR-BI的癌症和癌细胞系的其他非限制性实例。如本文所述,术语“过表达”或“增加的表达”是指在给定细胞、细胞类型或细胞状态中与参考细胞例如非癌细胞或不过表达SR-BI的癌细胞相比,给定基因产物的增加的表达水平。在一些实施方案中,癌细胞表达任何水平的SR-BI。

[0103] 纳米结构也可用于治疗 and 预防自身免疫疾病或病症。自身免疫性疾病或病症是一类疾病,其中受试者自身的抗体与宿主组织发生反应,或者其中免疫效应T细胞对内源性自身肽具有自身反应性并导致组织破坏。因此,针对受试者自身的抗原(称为自身抗原)产生免疫反应。自身免疫性疾病或病症包括但不限于类风湿性关节炎、克罗恩病、多发性硬化症、系统性红斑狼疮(SLE)、自身免疫性脑脊髓炎、重症肌无力(MG)、桥本氏甲状腺炎、古德帕斯彻氏综合征、天疱疮(例如,寻常天疱疮)、格雷夫氏病、自身免疫性溶血性贫血、自身免疫性血小板减少性紫癜、具有抗胶原抗体的硬皮病、混合性结缔组织病、多发性肌炎、恶性贫血、特发性Addison病、自身免疫相关性不孕症、肾小球肾炎(例如,新月体肾炎、增殖性肾小球肾炎)、大疱性类天疱疮、干燥综合征、胰岛素抵抗和自身免疫性糖尿病。

[0104] 含有有效量的组合物可用于预防性或治疗性治疗。在预防性应用中,可将组合物施用于具有对与胆固醇水平升高相关的疾病、心血管疾病、过度增殖性疾病(例如,癌症)、炎性疾病、血脂异常和其他与胆固醇有关的病理病况的发展的临床确定的易感性或增加的易感性的患者。本发明的组合物可以足以延迟、减少或优选预防临床疾病的发作的量施用至患者(例如人)。在治疗应用中,以足以治愈或至少部分地阻止病况及其并发症的症状

的量向已经患有心血管疾病、过度增殖性疾病(例如癌症)、炎性疾病和其他与胆固醇相关的病理状况的患者(例如人)施用组合物。足以实现该目的的量被定义为“治疗有效剂量”，即足以显著改善与疾病或医学病况相关的某些症状的化合物的量。治疗有效量的药剂或组合物不需要治愈疾病或病况，但将提供对疾病或病况的治疗，使得疾病或病况的发作被延迟、阻碍或预防，或疾病或病况症状得到改善，或疾病或病况的期限发生变化或例如严重程度降低，或个体中的恢复加快。

[0105] 在一方面，本公开内容涉及降低NF- κ B活性的方法，包括向受试者施用有效量的包含本公开内容的任何球形HDL-NP的组合物。

[0106] 如本文所用，“受试者”或“患者”是指任何哺乳动物(例如，人)。受试者或患者的实例包括人、非人灵长类动物、牛、马、猪、绵羊、山羊、狗、猫或啮齿动物，例如小鼠、大鼠、仓鼠或天竺鼠。一般而言，本发明涉及人的使用。

[0107] 在一些实施方案中，本公开内容的HDL样纳米颗粒在药物组合物中。这些“药物组合物”或“药学上可接受的”组合物可包含与一种或多种药学上可接受的载体、添加剂和/或稀释剂一起配制的治疗有效量的本文所述的一种或多种结构。本文所述的药物组合物可用于治疗败血症或其他相关疾病。应当理解，本文所述的任何合适的结构均可用于此类药物组合物，包括结合附图所述的那些。

[0108] 药物组合物可以特别配制用于以固体或液体形式施用，包括适用于以下的那些：口服施用，例如浸剂(水溶液或非水溶液或混悬液)，片剂，例如靶向口腔、舌下和全身吸收的那些，用于舌部应用的丸剂、粉剂、颗粒剂、糊剂；肠胃外施用，例如通过皮下、肌肉、静脉内或硬膜外注射，例如作为无菌溶液或混悬液或缓释制剂；局部应用，例如，作为应用于皮肤、肺或口腔的霜剂、软膏剂或控释贴剂或喷雾剂；阴道内或直肠内，例如作为子宫托、霜剂或泡沫；舌下；经眼；透皮；或鼻腔、肺部和施用到其他粘膜表面。

[0109] 本文所用短语“药学上可接受的”是指在合理的医学判断范围内适用于与人和动物的组织接触而与合理的收益/风险比相称地没有过度毒性、刺激、过敏反应或其他问题或并发症的那些结构、材料、组合物和/或剂型。

[0110] 本文使用的短语“药学上可接受的载体”是指参与将主题化合物从身体的一个器官或部分携带或运输到身体的另一个器官或部分的药学上可接受的材料、组合物或媒介物，例如液体或固体填充剂、稀释剂、赋形剂或溶剂封装材料。在与制剂的其他成分相容并且对患者无害的意义上，每种载体必须是“可接受的”。可用作药学上可接受的载体的材料的一些实例包括：糖类，例如乳糖、葡萄糖和蔗糖；淀粉，例如玉米淀粉和马铃薯淀粉；纤维素及其衍生物，例如羧甲基纤维素钠、乙基纤维素和醋酸纤维素；黄蓍胶粉；麦芽；明胶；滑石；赋形剂，例如可可脂和栓剂蜡；油类，例如花生油、棉籽油、红花油、芝麻油、橄榄油、玉米油和豆油；乙二醇，例如丙二醇；多元醇，例如甘油、山梨糖醇、甘露糖醇和聚乙二醇；酯类，例如油酸乙酯和月桂酸乙酯；琼脂；缓冲剂，例如氢氧化镁和氢氧化铝；海藻酸；无热原水；等渗盐水；Ringer溶液；乙醇；pH缓冲溶液；聚酯、聚碳酸酯和/或聚酐；和其他用于药物制剂的无毒相容物质。

[0111] 润湿剂、乳化剂和润滑剂，例如十二烷基硫酸钠和硬脂酸镁，以及着色剂、脱模剂、涂层剂、甜味剂、调味剂和加香剂、防腐剂和抗氧化剂也可以存在于组合物中。

[0112] 药学上可接受的抗氧化剂的例子包括：水溶性抗氧化剂，例如抗坏血酸、半胱氨酸

盐酸盐、硫酸氢钠、焦亚硫酸钠、亚硫酸钠等；油溶性抗氧化剂，例如抗坏血酸棕榈酸酯、丁基羟基茴香醚(BHA)、丁基羟基甲苯(BHT)、卵磷脂、没食子酸丙酯、 α -生育酚等；和金属螯合剂，例如柠檬酸、乙二胺四乙酸(EDTA)、山梨糖醇、酒石酸、磷酸等。

[0113] 本文所述的结构可以口服施用、肠胃外施用、皮下施用和/或静脉内施用。在某些实施方案中，结构或药物制剂经口施用。在其他实施方案中，静脉内施用该结构或药物制剂。替代的施用途径包括舌下、肌内和透皮施用。

[0114] 在一个方面，本公开内容涉及一种制备球形高密度脂蛋白纳米颗粒(HDL-NP)的方法，包括制备单链DNA-磷脂缀合物(ssDNA-PL)、制备四面体小分子-DNA杂合体(SMDH₄)，其中ssDNA-PL和SMDH₄具有互补的DNA序列，孵育ssDNA-PL和SMDH₄，使得互补DNA序列碱基配对形成DNA-PL核心，并将磷脂脂质体和载脂蛋白添加至DNA-PL核心以产生球形HDL-NP。

[0115] 在一些实施方案中，ssDNA-PL包含至少9个核苷酸的寡核苷酸。在一些实施方案中，寡核苷酸的长度为6-16个核苷酸。在一些实施方案中，寡核苷酸包含SEQ ID NO:1。在一些实施方案中，寡核苷酸的长度为18个核苷酸。在一些实施方案中，寡核苷酸包含SEQ ID NO:2。

[0116] 在一些实施方案中，SMDH₄包含至少9个核苷酸的寡核苷酸。在一些实施方案中，寡核苷酸的长度为9-15个核苷酸。在一些实施方案中，寡核苷酸包含SEQ ID NO:3。在一些实施方案中，寡核苷酸的长度为18个核苷酸。在一些实施方案中，寡核苷酸包含SEQ ID NO:4。

[0117] 在一些实施方案中，本文公开的任何方法的载脂蛋白是载脂蛋白A-I。

[0118] 无需进一步描述，据信本领域技术人员基于以上描述可以最大限度地利用本发明。因此，以下特定实施方案应被解释为仅是举例说明性的，而不以任何方式限制本公开内容的其余部分。出于本文引用的目的或主题，本文引用的所有出版物通过引用并入。

实施例

[0119] 如本文别处所述，DNA-PL₄核心以两步方式合成(参见本文合成部分)。首先，合成了DNA-磷脂缀合物(ssDNA-PL)和四面体小分子-DNA杂合体(SMDH₄) (表2)。其次，将具有互补碱基配对序列的ssDNA-PL和SMDH₄杂交以产生最终的DNA-PL₄核心(图2B和图6-9)。

[0120] 使用产生的核心支架，执行和优化了LC HDL NP的组装。通过在磷酸盐缓冲盐水(PBS:10mM Na₂HPO₄和137mM NaCl;pH=7.4)中重新悬浮薄膜(1mM DPPC)，然后超声处理，来从1,2-二棕榈酰磷脂酰胆碱(DPPC)制备脂质体。然后将PL₄核心支架制备为薄膜，同时改善的水溶性使得能够使用已经在水性缓冲液中的DNA-PL₄核心支架开始。然后将其他NP成分添加到核心支架中：首先是DPPC脂质体，其次是apoA-1，其各自预先悬浮在PBS中。将混合物进行三轮超声处理，使其在冰上松弛，然后过滤并使用50kDa MWC0离心柱浓缩，交替进行台式离心以去除聚集体(图2C)。

[0121] 对于使用PL₄和9-DNA-PL₄支架的颗粒组装体通过透射电子显微镜(TEM)观察到超结构的高单分散纳米颗粒(PL₄ HDL NP直径:10±2nm, 9-DNA-PL₄ HDL NP直径:9±2nm)(图2G和图13)。值得注意的是，颗粒的形态不是未成熟盘状HDL或rHDL(两者都表现出堆叠磷脂盘的标志性钱串形成^{17,22-23})的特征。相反，颗粒呈现大致球形，具有外围环形低密度区域。动态光散射实验揭示了类似于人HDL的流体动力学直径(对于PL₄ HDL NP和9-DNA-PL₄ HDL NP，分别地DH=13.8±3.9和13.3±4.6nm)(表3)。尺寸排阻色谱(SEC)显示对于9-DNA-PL₄

HDL NP和PL₄ HDL NP分别8.22和8.58-8.88mL的峰保留体积。LC HDL NP的SEC痕迹还显示与少量游离apoA-I (10.13mL保留体积) 一致的右侧尾部,这也在人HDL对照中观察到。虽然PL₄和9-DNA-PL₄支架成功地产生了低于20nm的颗粒,但在添加DPPC和apoA-1后,使用18-DNA-PL₄支架的组装体作为大泡状结构持续存在(图13)。在本文中,假设这是apoA-1组装的杂合体尺寸过大导致的。有趣的是,9-DNA-PL₄ HDL NP并不明显大于PL₄ HDL NP。该结果与使用18-DNA-PL₄的组装的缺乏相结合,表明LC HDL NP粒径可能主要由apoA-1蛋白质折叠决定,而与低于给定阈值的核心尺寸无关。由于LC HDL NP是使用9-DNA-PL₄而不是18-DNA-PL₄实现的,因此所有图和其余文本都将使用9-DNA-PL₄支架形成的颗粒简单地称为DNA-PL₄ HDL NP。

[0122] 为了在apoA-1蛋白质构象方面表征LC HDL NP结构,对LC HDL NP、apoA-1、从人血清中分离的HDL₂和HDL₃、以及无机模板HDL样纳米颗粒(Au HDL NP)进行圆二色谱分析。二级结构分析使用三个不同的参考蛋白质数据库进行。令人惊讶的是,发现PL₄ HDL NP和DNA-PL₄ HDL NP在二级结构中与人HDL非常相似,而相比之下Au HDL NP表现出过多的 α 螺旋性和显著较少的 β 折叠和转角含量(表1)(图2E)。为了进一步表征LC HDL NP结构,通过将LC HDL NP与双磺基琥珀酰亚胺辛二酸酯交联,然后进行免疫印迹来研究apoA-1的寡聚化状态¹⁸。发现ApoA-1与LC核心的相互作用诱导稳定的寡聚体形成(图16)。此外,LC HDL NP的表面zeta电位比单独的apoA-1 ($-10 \pm 3\text{mV}$) 或没有核心支架的apoA-1和DPPC ($-12 \pm 2\text{mV}$) 更负(PL₄: $-21 \pm 2\text{mV}$, DNA-PL₄: $-19 \pm 1\text{mV}$),但与人HDL2 ($-19 \pm 2\text{mV}$) 和HDL3 ($-21 \pm 5\text{mV}$) 一致。这些结果与寡聚反应一致,因为apoA-1寡聚物是高度带负电荷的。最后,确定了LC HDL NP的组成,并将它们与Au HDL NP和人HDL的组成进行了比较。发现LC HDL NP在每个组分的相对质量贡献方面与HDL₂和HDL₃非常相似,除了LC HDL NP不包含胆固醇或胆固醇酯(图2D;表4)。

[0123] 进行了补充生物测定以研究LC HDL NP是否可以概括显著的HDL功能。HDL模拟的关键特性是从脂质负载的巨噬细胞中排出胆固醇的能力。LC HDL NP的流出效率使用体外放射性标记的胆固醇流出测定(参见寡聚化测定部分)进行检查²⁴。简而言之,J774巨噬细胞装载有氚标记的胆固醇($\text{H}^3\text{-cho1}$),与cAMP一起培养以上调胆固醇流出受体,然后用纳米颗粒或对照处理4小时。对培养基上清液进行液体闪烁计数以定量流出的 $\text{H}^3\text{-cho1}$ 的百分比。PL₄ HDL NP和DNA-PL₄ HDL NP均以剂量依赖性方式促进强健的胆固醇流出(PL₄: $6.2 \pm 0.7\%$, DNA-PL₄: $6.5 \pm 0.2\%$; 100nM蛋白质),而使用核心支架和单独的脂质的对照组表现出最小的流出能力(图3A)。

[0124] 除了流出外,胆固醇输送是由成熟的HDL在天然环境中执行的专门功能。为了评估LC HDL NP作为胆固醇递送剂的功效,培养的肝细胞(HepG2)以荧光胆固醇(NBD-cho1)和LC HDL NP或对照共同处理,随后进行处理以用于流式细胞术或共聚焦显微术。LC HDL NP仅在30分钟内促进NBD-cho1的有效递送(图4),PL₄ HDL NP处理的细胞中的23%为NBD阳性,而相比之下Au HDL NP和apoA-1分别为5.7%和6.8%。

[0125] 然后设计了一项实验,以在单个测定中模拟整个反向胆固醇转运过程。这是通过执行标准放射性标记流出测定,然后是流入步骤来实现的,由此将条件流出培养基引入HepG2细胞并允许流入再进行4小时。然后对来自巨噬细胞、肝细胞和培养基上清液的所有三个级分进行液体闪烁计数。本文的结果(图3B-3C)表明,与apoA-1 (**p<0.01) 和Au HDL NP (***)p<0.001) 相比,LC HDL NP表现出优异的胆固醇转运能力。总体上,此测定证明不仅

LC HDL NP能够实现强大的胆固醇流出和递送,而且单个颗粒队列可以通过以动态方式加载和卸载胆固醇来顺序执行这些功能。

[0126] 材料和仪器

[0127] 除非另有说明,所有试剂和试剂级溶剂均购自Sigma-Aldrich (Milwaukee,WI) 并按原样使用。所有脂质(1,2-二棕榈酰-sn-甘油-3-磷酸乙醇胺-N-二苯并环辛基(DBCO PE)和1,2-二棕榈酰-sn-甘油-3-磷酸胆碱(DPPC))和荧光胆固醇(22-(N-(7-硝基苯-2-氧杂-1,3-重氮-4-基)氨基)-23,24-Bisnor-5-Cholen-3 β -01((NBD)-胆固醇))获自Avanti Polar Lipids (Alabaster,AL)。ApoA-I蛋白获自MyBioSource (San Diego,CA)。所有化学品均在未经进一步纯化的情况下使用。从Millipore系统(Milli-Q Biocel)获得超纯去离子(DI)H₂O(18.2M Ω ·cm电阻率)。四(4-叠氮苯基)甲烷¹和脂质亚磷酰胺²根据先前公布的程序合成。

[0128] 己炔基官能化DNA链和DNA-脂质缀合物的合成在Expedite8909核酸系统上进行。DNA产物分别在配备反相(RP)半制备型(Dynamax,250 $\times$ 10mm,Microsorb**300** Å/10 μ m/C18,Agilent#R083213C10)和分析型(Dynamax,100 $\times$ 4.6mm,Microsorb**100** Å/3 μ m/C18,Agilent#R0080200E3)柱子的Agilent 1100HPLC上纯化和分析。在Thermomixer R 5355(Eppendorf AG North America,Hauspauge,NY)仪器中进行己炔基官能化DNA与四(4-叠氮苯基)甲烷的偶联。DNA材料的吸收光谱在Varian Cary 300Bio UV-vis分光光度计(Varian,Inc.,Palo Alto,CA)上使用掩膜石英池记录(路径长度=10mm,目录号#29B-Q-10-MS,Starna cells Inc.,Atascadero,CA)。使用在120kV下运行的FEI Tecnai Spirit TEM,使用300目碳涂覆的铜网格(Electron Microscopy Services)获得负染色透射电子显微镜(TEM)图像。使用Nikon A1R光谱显微镜进行共聚焦成像。使用BD LSRFortessa细胞分析仪进行流式细胞术。在Bruker AutoFlex III MALDI-ToF质谱仪(Bruker Daltonics,Billerica,MA)上使用线性模式收集基质辅助激光解吸/电离飞行时间(MALDI-ToF)质谱数据作为负离子。该仪器配备了以30-40%的功率运行的SmartbeamTM激光技术,使用10Hz的采样速度。对于每个质谱,平均一千次扫描。来自Agilent HPLC和Bruker MALDI-ToF仪器的数据使用MestreNova软件版本8.1.1-11591进行处理。

[0129] 合成

[0130] a.DNA-PL₄核心的合成。

[0131] a-1.9-SMDH₄和18-SMDH₄的合成和纯化

[0132] 具有9-和18-merDNA臂(分别为9-SMDH₄(SEQ ID NO:1)和18-SMDH₄(SEQ ID NO:2))的小分子DNA杂合体(SMDH)根据先前公布的程序³进行合成和纯化并且本研究中使用的DNA序列列于表2中。为了鉴定在SMDH制备中形成的不同产物,首先使用分析型RP-HPLC柱和从95:5v/v 0.1M TEAA(aq):MeCN(TEAA(aq)=三乙基醋酸铵,水溶液)开始并在35分钟内增加到60:40v/v 0.1M TEAA(aq):MeCN(以+1vol%MeCN/min的斜率)的梯度方法分析收集的粗SMDH样品的等分试样(参见本文的材料和仪器部分),流速为1mL/min。然后,使用半制备型RP-HPLC柱(参见本文的材料和仪器部分)和从95:5v/v 0.1M TEAA(aq):MeCN开始并在70分钟内增加到60:40v/v 0.1M TEAA(aq):MeCN(以+0.5vol%MeCN/min的斜率,此处使用较慢的梯度以确保峰的充分分离)的梯度方法对整个样品进行纯化,流速为3mL/min。收集的SMDH₄产物的身份通过MALDI-ToF MS分析(图6-7中的插图)确认,并使用分析型RP-HPLC(图

6-7) 利用上述分析型RP-HPLC溶剂程序重新评估其纯度。

[0133] a-2.DNA-磷脂缀合物的固相合成和纯化

[0134] 使用附着至表面的含有 $1\mu\text{mol}$ 腺嘌呤 (Glen Research, dA-CPG#20-2001-10, (1000 Å , $28\mu\text{mol/g}$)) 或胸腺嘧啶 (Glen Research, dT-CPG#20-2031-10 (1000 Å , $27\mu\text{mol/g}$)) 的可控孔玻璃 (CPG) 珠从3' 方向进行合成。将CPG珠置于 $1\mu\text{mol}$ 合成柱中并随后使用标准 $1\mu\text{mol}$ 方案在Expedite 8909合成仪上添加3'-亚磷酰胺 (Glen Research, dA-CE亚磷酰胺#10-1000-C5, Ac-dC-CE亚磷酰胺#10-1015-C5, dmf-dG-CE亚磷酰胺#10-1029-C5, dT-CE亚磷酰胺#10-1030-C5) 以制备CPG-3'-ssDNA (序列参见表2)。将脂质亚磷酰胺添加到ssDNA链的5' 末端, 然后用干燥的氮气流将珠子干燥并放入含有新鲜AMA水溶液 (30重量% 氢氧化铵水溶液和40重量% 甲胺水溶液的1mL的1:1v/v混合物) 的小瓶中。然后将小瓶加盖并在 65°C 加热15分钟以从固体支持物裂解DNA-脂质缀合物。然后将干燥氮气流通过小瓶内容物直到特征性氨气味消失来去除氨和甲胺副产物。通过移液管收集含有粗制DNA-脂质缀合物的剩余液体, 并用超纯去离子水 ($200\mu\text{L}$) 进一步提取剩余的珠子。将提取物与粗制DNA-脂质缀合物的初始溶液 (最终提供 0.4mL 的总体积) 合并, 并通过 $0.45\mu\text{m}$ 尼龙注射器过滤器 (Acrodisc®13mm注射器过滤器#PN4426T) 过滤。将收集的粗产物样品经受使用分析型RP-HPLC (图8-9) 和以95:5v/v 0.1M TEAA (aq) : MeCN (TEAA (aq) = 三乙基乙酸铵, 水溶液) 开始并在50分钟内增加到100% MeCN (以 $+1.9\text{vol}\%\text{MeCN}/\text{min}$ 的斜率) 的梯度方法的纯化, 流速为 $1\text{mL}/\text{min}$ 。通过MALDI-ToF分析 (图8-9中的插图) 确认收集的产物的身份, 并通过变性聚丙烯酰胺凝胶电泳 (PAGE) (图9) 验证其纯度。

[0135] a-3.DNA-磷脂缀合物和SMDH₄的组装

[0136] 将所制备的SMDH₄及其互补DNA-脂质缀合物在TAMg缓冲溶液 (40mM Tris、20mM 乙酸和7.5mM MgCl₂; pH7.4) 中的等摩尔混合物加入 0.5mL Eppendorf管中。然后将所得溶液在加热块 (Thermomixer R; Eppendorf, Hauppauge, NY) 中加热至 90°C , 并在那里保持5分钟以去除所有初始DNA相互作用。然后关闭加热块的电源以允许溶液在3小时内缓慢冷却至rt (有关该设备的典型冷却特征谱, 请参见Yildirim, I.; Eryazici, I.; Nguyen, S.T.; Schatz, G.C.J. Phys. Chem. B 2014, 118, 2366-2376的补充信息中的图S16)。

[0137] b. PL₄核心的合成。

[0138] b-1. 四 (4-叠氮苯基) 甲烷的合成

[0139] 四 (4-叠氮苯基) 甲烷是根据先前公布的程序合成的¹。

[0140] b-2. DBCO PE与四 (4-叠氮苯基) 甲烷的缀合

[0141] PL₄核心材料是通过1,2-二棕榈酰-sn-甘油-3-磷酸乙醇胺-N-二苯并环辛基 (DBCO PE) 与四面体小分子核心 (四 (4-叠氮苯基) 甲烷) 的无铜点击化学缀合合成的 (图11)。在典型的点击化学反应中, DBCO PE和四 (4-叠氮苯基) 甲烷各自以 $0.1\text{wt}\%$ 溶解在N,N-二甲基甲酰胺 (DMF) (Sigma Aldrich) 中, 并以DBCO PE与四 (4-叠氮苯基) 甲烷的10:1摩尔比在DMF中混合。将反应混合物进行三轮交替涡旋和水浴超声处理, 然后允许在涡旋下在室温反应24小时。然后使用电喷雾电离质谱来表征所得产物 (图12)。

[0142] c. LC HDL NP组装

[0143] 通过首先制备1,2-二棕榈酰-sn-甘油-3-磷酸胆碱 (DPPC) 脂质体来进行纳米颗粒组装。将DPPC以 $0.1\text{wt}\%$ 溶解在5mL玻璃小瓶中的氯仿中。然后通过用N₂气体蒸发溶剂产生

薄膜。该膜在干燥器中在减压下进一步干燥>2小时。然后通过交替水浴超声处理和涡旋的情况下以1mM的DPPC浓度将薄膜重新悬浮在磷酸缓冲盐水(PBS:10mM磷酸盐和137mM NaCl, pH=7.4)中来产生脂质体。对于PL₄ HDL NP, PL₄核心支架是通过与上文对于DPPC所述的相同方式从DMF中的0.1wt%溶液生成薄膜来制备的。对于DNA-PL₄ HDL NP, 由于寡核苷酸提高了核心的水溶性, 核心支架开始于TAMg缓冲溶液(40mM Tris、20mM乙酸和7.5mM MgCl₂; pH=7.4)中。为了启动颗粒组装, 随后将非支架纳米颗粒组分依次添加到核心支架中。在典型的组装中, 将40nmol的DPPC添加到2nmol脂质缀合物核心支架(PL₄或DNA-PL₄)中, 然后添加4nmol的apoA-1, 其中DPPC和apoA-1都预悬浮在PBS中。然后将悬浮液在PBS中稀释至PBS中10uM的最终核心浓度。悬浮液经受三轮交替水浴超声处理(90秒开启, 30秒关闭)和涡旋, 并允许在冰上松弛>30分钟。然后使用0.5mL 50kDa MWC0离心柱(MilliPore)过滤和浓缩颗粒。柱子首先在PBS中以10,000xg在4℃冲洗10分钟, 然后在相同条件下对颗粒进行三轮旋转过滤。每次旋转后将500uL PBS添加到柱子中, 使得每个颗粒悬浮液的溶剂在旋转过滤后都是PBS, 其中对于DNA-PL₄ HDL NP从溶液中去掉TAMg缓冲液。每轮过滤后, 通过桌面离心将颗粒离心以去除任何聚集体。最后一轮过滤后, 将少量浓缩颗粒(~20uL)在PBS中稀释至100-200uL, 并通过二辛可宁酸测定(BCA)确定蛋白质浓度, 其中在与BCA试剂在37℃孵育30分钟后在562nm处进行吸光度的光谱测量。然后将颗粒立即使用或放置在4℃以用于短期储存。

[0144] d. 用于TEM的对照的制备

[0145] 制备对照样品以研究LC HDL NP组装过程及其对脂质缀合的核心支架和apoA-1的依赖性。核心+支架无apoA-1对照是通过如上所述制备DPPC脂质体来制备的(参见本文的合成部分)。然后将DPPC脂质体以与LC HDL NP中相同的浓度和摩尔比添加到核心支架中, 其中PL₄支架薄膜化和DNA-PL₄支架在水性缓冲液(PBS)中。然后将混合物进行三轮交替超声处理和涡旋, 并过滤和如上所述通过50kDa MWC0离心柱浓缩。apoA-1和DPPC单独对照在没有核心支架的情况下以相同的方式组装。

[0146] 负染色透射电子显微术

[0147] 对于网格制备, 样品在PBS中以1-2μM蛋白质的浓度制备, 在经过紫外线处理的碳涂覆的铜300目网格(Electron Microscopy Services)上滴铸, 并在化学通风橱中风干。网格用PBS洗涤两次, 用2%乙酸双氧铀染色两次, 持续20秒, 然后用PBS洗涤3次并在成像前风干。使用在80kV下运行的FEI Tecnai Spirit TEM进行成像。

[0148] 圆二色谱

[0149] 圆二色谱使用JASCO J-815CD光谱仪进行。所有样品均在蒸馏水中稀释至75ug/mL蛋白质。光谱来源于单个样品的三个累积。二级结构数据是使用运行分析算法CONTIN的CDPro软件包获得的。使用不同的可溶性蛋白质参考集进行了三种不同的分析。表1中报告的值反映了这三种分析的平均值±SEM结果。

[0150] 组成表征

[0151] a. 蛋白质定量。为了定量纳米颗粒和天然HDL的蛋白质含量, 我们按照制造商的说明使用了市售的二辛可宁酸(BCA)测定(Thermo Fisher)。简而言之, 我们通过使用BCA试剂溶液在96孔板中将牛血清白蛋白(BSA)样品从0.125-2mg/mL稀释到每孔80μL的最终体积来生成蛋白质标准曲线。纳米颗粒样品以同样的方式稀释; 标准品和样品稀释40倍。标准品一

式两份铺板,和样品一式三份铺板。将板子在37℃孵育30分钟,然后使用Synergy读板器测量562nm处的吸光度。

[0152] b. 磷脂定量。根据制造商的说明,使用比色磷脂测定试剂盒 (Sigma-Aldrich) 定量纳米颗粒和天然HDL的磷脂含量。简而言之,通过连续稀释制备从15μM至200μM的磷脂标准曲线。样品在PBS中连续稀释以获得标准曲线范围内的一种或多种稀释度。然后将样品和标准品与酶反应混合物在室温孵育30分钟,然后使用Synergy读板器测定572nm处的吸光度。

[0153] c. 胆固醇、胆固醇酯和核心定量。根据制造商的说明,使用Amplex Red胆固醇测定 (Thermo Fisher) 测定胆固醇和胆固醇酯浓度。简而言之,在试剂盒提供的水性缓冲液中制备从8ug/mL至125ng/mL的胆固醇标准曲线。两组样品一式三份制备并稀释到1x反应缓冲液中。然后制备含有过氧化氢、试卤灵和辣根过氧化物酶、胆固醇氧化酶的两种反应混合物,其中有或没有胆固醇酯酶以实现游离胆固醇和胆固醇酯的定量。然后将一组样品与含有胆固醇酯酶的反应混合物一起孵育,另一组样品与不含胆固醇酯酶的反应混合物一起孵育。然后将微孔板在37℃孵育1小时或直到荧光信号开始下降。DNA-PL₄ HDL NP的核心浓度是通过UV-Vis光谱法测量260nm处的吸光度来确定的。由于无法直接确定PL₄核心浓度,因此使用对于DNA-PL₄颗粒获得的实验确定的核心:蛋白质摩尔比来估计核心浓度。值得注意的是,这种近似假设PL₄ HDL NP和DNA-PL₄ HDL NP的每个颗粒的apoA-1分子的相同平均拷贝数,考虑到TEM观察到的相似粒径,这可能是一个非常近似的值。Au HDL NP的组成报告自先前发表的工作⁴。

[0154] 寡聚化测定。

[0155] a. 交联颗粒和蛋白质样品的制备。在通过免疫印迹检测之前,交联剂双[磺基琥珀酰亚胺]辛二酸盐 (BS3) (Sigma Aldrich) 用于在组装时稳定LC HDL NP中apoA-1的任何高级寡聚化状态。这里使用的方法改编自先前报告的方案⁴。LC HDL NP如上文所述制备并在PBS中稀释至50μg/mL蛋白质。然后将BS3交联剂添加到LC HDL NP,使最终BS3浓度为2.5mM,并使反应在室温进行30分钟。为了产生apoA-1寡聚体阶梯,无脂纯apoA-1 (MyBioSource) 在PBS中透析,然后在升高的蛋白质浓度 (500μg/mL) 下与BS3 (0.25mM) 在室温交联4小时。0.5M Tris碱用于终止交联反应 (最终浓度为45mM)。

[0156] b. apoA-1免疫印迹。BioRad装置用于凝胶电泳和蛋白质转移。使用预制4-20%聚丙烯酰胺凝胶 (MiniProtean TGX, BioRad) 用于分离。使用含有20vol%甲醇的Tris-甘氨酸缓冲液将蛋白质转移到聚偏二氟乙烯 (PVDF) 膜上。PVDF膜然后在TBS中漂洗并在室温在5wt%脱脂奶粉中封闭1小时。将一抗 (兔抗apoAI, Abcam) 以在5wt%脱脂奶粉中的1:1000稀释添加至膜,并在4℃孵育过夜。然后将膜在TBS-Tween (0.1%) 中洗涤3次,每次10分钟。然后将二抗 (山羊抗兔HRP, BioRad) 以在5wt%脱脂奶粉中的1:2000稀释添加。然后将膜在TBS-Tween中洗涤3次,每次10分钟,然后在电化学发光底物溶液中浸泡1分钟,并曝光至放射自显影胶片持续10-90秒以获得最佳曝光时间并显影 (图16)。

[0157] 放射性标记测定。

[0158] a. 流出测定:对于流出实验,我们使用了现场的金标准测定法,即来自J774巨噬细胞的氚标记胆固醇 (H³-chol) 的流出。将J774巨噬细胞培养至少两代,随后在第1天以每孔150,000个细胞接种在RPMI、10%胎牛血清 (FBS)、1%青霉素-链霉素 (PenStrep) 中的24孔板中。H³-chol的乙醇原液在无菌条件下处理。蒸发H³-chol原液,重新溶解在1mL乙醇中,并

在37℃孵育60分钟。然后再次蒸发溶液并重新溶解在50μL乙醇中,并在37℃孵育30分钟。然后将热灭活的FBS (Corning, NY) 添加到 H^3 -chol溶液中,并在4℃孵育过夜。在第2天,将含有1%PenStep和2μg/mL Sandoz (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO) 的无血清RPMI添加到含有 H^3 -chol的FBS中,以产生RPMI中的2uCi/mL H^3 -chol、5vol%FBS的最终标记培养基。注意, Sandoz是一种用于防止 H^3 -chol的酯化的ACAT抑制剂。从24孔板中吸出培养基并加入500μL H^3 -chol标记培养基(每孔1uCi)。标记允许进行24小时。在第3天,去除标记培养基,用MEM、25μM HEPES洗涤细胞两次,并添加上调培养基(RPMI、1%PenStrep、300μM cAMP、2μg/mL Sandoz、1%BSA)以上调经典胆固醇流出受体ABCA1。(注意:对于cAMP(-)流出测定(图4D),加入不含cAMP的该培养基以研究SR-B1依赖性流出。)在添加流出培养基之前允许上调进行24小时。在无血清培养基(MEM, 25μM HEPES, 1%PenStrep)中制备含有纳米颗粒和对照的流出样品,以减少血清胆固醇载体的非特异性 H^3 -chol流出。根据治疗方案,将细胞在MEM、25μM HEPES中洗涤两次,并将流出培养基添加到每个孔中。允许流出进行4小时。然后移除流出培养基,将其真空过滤,并添加到3mL UltimaGold闪烁液中用于闪烁计数。将 H^3 -chol加载的巨噬细胞的单独的一式三份队列洗涤、风干并在室温在异丙醇中孵育以提取 H^3 -chol作为在流出开始时 $t=0$ 时总胆固醇的量度。PBS处理的对照组被用作基线,然后从实验组中减去对于这些样品获得的计数以获得基线校正的计数。然后将流出百分比计算为流出培养基的基线校正计数与 $t=0$ 巨噬细胞计数的比率,指示在4小时治疗过程中不仅仅是由于扩散从细胞中去除的 H^3 -chol的分数。

[0159] b. 串联流出-流入测定:对于流出-流入实验,与上述相同地进行流出。在第3天,将肝细胞(HepG2细胞)以100,000个细胞/孔在DMEM、10%FBS、1%PenStrep中接种于24孔板中。在第4天,在流出4小时后立即将HepG2细胞在无血清MEM、25μM HEPES中洗涤两次并将来自J774巨噬细胞的流出培养基去除和直接添加到HepG2细胞中。在收获前允许流入进行4小时。然后收集流入培养基上清液并按照与上述流出培养基相同的方式进行处理。然后通过室温在500μL异丙醇中孵育4小时从HepG2细胞中提取 H^3 -chol,将其密封在石蜡膜中。然后收集含 H^3 -chol的异丙醇、将其蒸发并重新溶解在二甲苯中,随后加入UltimaGold用于闪烁计数。

[0160] NBD-胆固醇递送实验

[0161] a. 共聚焦显微术。HepG2细胞在含有10%FBS和1%PenStrep的Dulbecco改良Eagle培养基(DMEM)中培养。处理前一天,将细胞以100,000个细胞/孔接种在24孔板中的玻璃盖玻片顶部。在处理当天,将细胞用PBS洗涤3次,然后根据处理方案使用或不使用递送剂将含有5ug/mL NBD-胆固醇的新鲜培养基加入到每个孔中。当将细胞固定并准备用于共聚焦显微术时,允许摄取进行30分钟。细胞在4%PFA中在室温固定10分钟。然后将细胞在PBS中洗涤3次,用DAPI(在PBS中的300nM)染色5分钟,然后在PBS中再洗涤两次。然后使用Fluoromount G安装介质将盖玻片安装在载玻片上,并在成像前允许在室温密封至少24小时。共聚焦显微术使用Nikon A1R Spectral进行,图像处理使用Nikon Elements和Fiji软件进行。

[0162] b. 流式细胞术。在处理前一天,将HepG2细胞以200,000个细胞/孔接种在24孔板中。在处理当天,将细胞用PBS洗涤3次,然后根据处理方案使用或不使用递送剂将含有5ug/mL NBD-胆固醇的新鲜培养基加入到每个孔中。在收获前允许摄取进行30分钟。然后用胰蛋

白酶消化细胞,在含血清的培养基中中和,并以300xg离心6分钟以沉淀细胞。将细胞重悬于含有2%牛血清白蛋白(BSA)的PBS中,然后使用BD LSRFortessa细胞分析仪(BD Biosciences)进行流式细胞术。使用FlowJo软件进行分析。在NBD-cho1阳性的定量之前,对事件进行门控以排除细胞碎片和聚集体。

[0163] 卵磷脂胆固醇酰基转移酶(LCAT)活性测定

[0164] 将悬浮在PBS中的LC HDL NP和Au HDL NP (250nM)与PBS中的LCAT (10nM)和游离胆固醇(100 μ g/mL)在以300rpm摇动的ThermoMixer中在37 $^{\circ}$ C孵育15小时。然后将样品通过50kDa离心柱以10,000g离心3次持续10分钟以去除多余的未结合胆固醇。然后在使用Amplex Red胆固醇测定(Thermo Fisher)进行定量之前,将样品在1 $\times$ 反应缓冲液中稀释100倍。Amplex Red胆固醇测定按照制造商的说明进行。简而言之,通过在试剂盒提供的水性缓冲液中将胆固醇从8 μ g/mL连续稀释到125ng/mL并将50 μ l添加到96孔黑底微孔板中来制备胆固醇标准曲线。还向微孔板的每个孔中一式三份添加50 μ l样品。制备了两组Amplex Red反应混合物,含有和不含胆固醇酯酶。然后将50 μ l Amplex Red反应混合物加入每个孔中。微孔板在37 $^{\circ}$ C孵育1小时或直到荧光信号开始下降。

[0165] NF- κ B活性测定

[0166] 对于NF- κ B活性实验,THP1-Dual细胞与QUANTI-Blue分泌的胚胎碱性磷酸酶(SEAP)检测试剂盒(Invivogen)结合使用。THP1-Dual细胞在含有10%FBS的RPMI中悬浮培养,并在用于实验之前传代至少两次。THP1-Dual细胞以每孔100,000个细胞接种在96孔板中。脂多糖(LPS) (5ng/mL)用于刺激NF- κ B活性。在添加纳米颗粒或对照之前,用LPS处理实验孔1小时。然后在检测前将细胞与颗粒或对照孵育24小时。QUANTI-Blue溶液通过将包装中的内容物溶解在无内毒素的水中并在37 $^{\circ}$ C孵育30分钟来制备。将QUANTI-Blue溶液(180 μ L)添加到96孔板的每个孔中。然后将THP1-Dual细胞上清液(20 μ L)添加到QUANTI-Blue溶液中,并将板子在37 $^{\circ}$ C孵育2-4小时。SEAP水平通过使用Synergy读板器检测650nm处的吸光度来定量。

[0167] 表1:通过圆二色谱对天然和合成HDL进行结构分析

	α -螺旋(%)	β -折叠(%)	转角(%)	无序(%)
apoA-1	57 $\pm$ 3	4 $\pm$ 2	14 $\pm$ 3	25 $\pm$ 5
Au HDL NP	73 $\pm$ 1	0 $\pm$ 0	6 $\pm$ 1	21 $\pm$ 2
HDL₂	50 $\pm$ 2	7 $\pm$ 1	18 $\pm$ 4	24 $\pm$ 2
HDL₃	42 $\pm$ 1	15 $\pm$ 1	15 $\pm$ 1	28 $\pm$ 3
PL₄ HDL NP	50 $\pm$ 1	7 $\pm$ 1	16 $\pm$ 5	27 $\pm$ 1
DNA-PL₄ HDL NP	40 $\pm$ 1	20 $\pm$ 2	16 $\pm$ 2	25 $\pm$ 7

[0169] 表2:SMDH₄ DNA臂和DNA-脂质缀合物的DNA序列列表

[0170]

DNA 长度	DNA 序列*	SEQ ID NO:
9-SMDH ₄	3'-TCG GCT GGA-小分子	1
18-SMDH ₄	3'-TTG CTG AGT ATA ATT GTT-小分子	2
9-DNA-脂质	3'-TCC AGC CGA-脂质	3
18-DNA-脂质	3'-AAC AAT TAT ACT CAG CAA-脂质	4

[0171] *SMDH₄ DNA臂的DNA序列与DNA-脂质缀合物的DNA序列(即9-SMDH₄(SEQ ID NO:1)至9-DNA-脂质(SEQ ID NO:3)和18-SMDH₄(SEQ ID NO:2)至18-DNA-脂质(SEQ ID NO:4))互补。

[0172] 表3:LC HDL NP和对照的动态光散射结果

[0173]

样品	流体力学直径 (nm)
游离apoA-I	7.6±0.2
人HDL ₂	14.1±5.0
人HDL ₃	13.6±6.1
PL ₄ HDL NP	13.8±3.9
DNA-PL ₄ HDL NP	13.3±4.6

[0174] 表4:LC HDL NP的组成

[0175]

样品	apoA-I/核心支架(mol/mol)	DPPC/核心支架(mol/mol)	DPPC/apoA-I(mol/mol)
PL ₄ HDL NP	-	89*	35
DNA-PL ₄ HDL NP	2.56	54	21

[0176] *使用对于DNA-PL₄ HDL NP实验测定的蛋白质/核心支架比率计算。

[0177] 表5:天然HDL的摩尔组成

[0178]

	apoA-I	鞘磷脂	磷脂酰胆碱	游离胆固醇	胆固醇酯	甘油三酯	Lyso-PC
拷贝数	2	19	109	50	90	19	10

[0179] 参考资料

[0180] 1.Roth,G.A.;Huffman,M.D.;Moran,A.E.;Feigin,V.;Mensah,G.A.;Naghavi,M.;Murray,C.J.,Global and regional patterns in cardiovascular mortality from 1990to 2013.Circulation 2015,132(17),1667-78.

- [0181] 2. Shepard, D.; VanderZanden, A.; Moran, A.; Naghavi, M.; Murray, C.; Roth, G., Ischemic Heart Disease Worldwide, 1990 to 2013: Estimates From the Global Burden of Disease Study 2013. *Circ Cardiovasc Qual Outcomes* 2015, 8(4), 455-6.
- [0182] 3. Feig, J.E.; Rong, J.X.; Shamir, R.; Sanson, M.; Vengrenyuk, Y.; Liu, J.; Rayner, K.; Moore, K.; Garabedian, M.; Fisher, E.A., HDL promotes rapid atherosclerosis regression in mice and alters inflammatory properties of plaque monocyte-derived cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 2011, 108(17), 7166-71.
- [0183] 4. Yvan-Charvet, L.; Wang, N.; Tall, A.R., Role of HDL, ABCA1, and ABCG1 transporters in cholesterol efflux and immune responses. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2010, 30(2), 139-43.
- [0184] 5. Lacko, A.G.; Sabnis, N.A.; Nagarajan, B.; McConathy, W.J., HDL as a drug and nucleic acid delivery vehicle. *Front Pharmacol* 2015, 6, 247.
- [0185] 6. Rosenson, R.S.; Brewer, H.B., Jr.; Chapman, M.J.; Fazio, S.; Hussain, M.M.; Kontush, A.; Krauss, R.M.; Otvos, J.D.; Remaley, A.T.; Schaefer, E.J., HDL measures, particle heterogeneity, proposed nomenclature, and relation to atherosclerotic cardiovascular events. *Clin Chem* 2011, 57(3), 392-410.
- [0186] 7. Kontush, A.; Chapman, M.J., Functionally defective high-density lipoprotein: a new therapeutic target at the crossroads of dyslipidemia, inflammation, and atherosclerosis. *Pharmacol Rev* 2006, 58(3), 342-74.
- [0187] 8. Simonsen, J.B., Evaluation of reconstituted high-density lipoprotein (rHDL) as a drug delivery platform—a detailed survey of rHDL particles ranging from biophysical properties to clinical implications. *Nanomedicine* 2016, 12(7), 2161-2179.
- [0188] 9. Cao, Y.N.; Xu, L.; Han, Y.C.; Wang, Y.N.; Liu, G.; Qi, R., Recombinant high-density lipoproteins and their use in cardiovascular diseases. *Drug Discov Today* 2017, 22(1), 180-185.
- [0189] 10. Andrews, J.; Janssan, A.; Nguyen, T.; Pisaniello, A.D.; Scherer, D.J.; Kastelein, J.J.; Merkely, B.; Nissen, S.E.; Ray, K.; Schwartz, G.G.; Worthley, S.G.; Keyserling, C.; Dasseux, J.L.; Butters, J.; Girardi, J.; Miller, R.; Nicholls, S.J., Effect of serial infusions of reconstituted high-density lipoprotein (CER-001) on coronary atherosclerosis: rationale and design of the CARAT study. *Cardiovasc Diagn Ther* 2017, 7(1), 45-51.
- [0190] 11. Kataoka, Y.; Andrews, J.; Duong, M.; Nguyen, T.; Schwarz, N.; Fendler, J.; Puri, R.; Butters, J.; Keyserling, C.; Paolini, J.F.; Dasseux, J.L.; Nicholls, S.J., Regression of coronary atherosclerosis with infusions of the high-density lipoprotein mimetic CER-001 in patients with more extensive plaque burden. *Cardiovasc Diagn Ther* 2017, 7(3), 252-263.
- [0191] 12. Keyserling, C.H.; Barbaras, R.; Benghozi, R.; Dasseux, J.L., Development

of CER-001:Preclinical Dose Selection Through to Phase I Clinical Findings.Clin Drug Investig 2017,37(5),483-491.

[0192] 13.Mendivil,C.O.;Furtado,J.;Morton,A.M.;Wang,L.;Sacks,F.M.,Novel Pathways of Apolipoprotein A-I Metabolism in High-Density Lipoprotein of Different Sizes in Humans.Arterioscler Thromb Vasc Biol 2016,36(1),156-65.

[0193] 14.Thaxton,C.S.;Daniel,W.L.;Giljohann,D.A.;Thomas,A.D.;Mirkin,C.A., Templated Spherical High Density Lipoprotein Nanoparticles.2009.

[0194] 15.Skajaa,T.;Cormode,D.P.;Falk,E.;Mulder,W.J.;Fisher,E.A.;Fayad,Z.A., High-density lipoprotein-based contrast agents for multimodal imaging of atherosclerosis.Arterioscler Thromb Vasc Biol 2010,30(2),169-76.

[0195] 16.Cormode,D.P.;Skajaa,T.;van Schooneveld,M.M.;Koole,R.;Jarzyna,P.; Lobatto,M.E.;Calcagno,C.;Barazza,A.;Gordon,R.E.;Zanzonico,P.;Fisher,E.A.; Fayad,Z.A.;Mulder,W.J.,Nanocrystal core high-density lipoproteins:a multimodality contrast agent platform.Nano Lett 2008,8(11),3715-23.

[0196] 17.Forte,T.M.;Nordhausen,R.W.,Electron microscopy of negatively stained lipoproteins.Methods Enzymol 1986,128,442-57.

[0197] 18.Luthi,A.J.;Lyssenko,N.N.;Quach,D.;McMahon,K.M.;Millar,J.S.; Vickers,K.C.;Rader,D.J.;Phillips,M.C.;Mirkin,C.A.;Thaxton,C.S.,Robust passive and active efflux of cellular cholesterol to a designer functional mimic of high density lipoprotein.Journal of lipid research 2015,56(5),972-85.

[0198] 19.Plebanek,M.P.;Mutharasan,R.K.;Volpert,O.;Matov,A.;Gatlin,J.C.; Thaxton,C.S.,Nanoparticle Targeting and Cholesterol Flux Through Scavenger Receptor Type B-1 Inhibits Cellular Exosome Uptake.Scientific reports 2015,5, 15724.

[0199] 20.Cormode,D.P.;Roessl,E.;Thran,A.;Skajaa,T.;Gordon,R.E.;Schlomka, J.P.;Fuster,V.;Fisher,E.A.;Mulder,W.J.;Proksa,R.;Fayad,Z.A.,Atherosclerotic plaque composition:analysis with multicolor CT and targeted gold nanoparticles.Radiology 2010,256(3),774-82.

[0200] 21.McMahon,K.M.;Mutharasan,R.K.;Tripathy,S.;Veliceasa,D.;Bobeica,M.; Shumaker,D.K.;Luthi,A.J.;Helfand,B.T.;Ardehali,H.;Mirkin,C.A.;Volpert,O.; Thaxton,C.S.,Biomimetic High Density Lipoprotein Nanoparticles For Nucleic Acid Delivery.2011.

[0201] 22.Zhao,Y.;Imura,T.;Leman,L.J.;Curtiss,L.K.;Maryanoff,B.E.;Ghadiri, M.R.,Mimicry of high-density lipoprotein:functional peptide-lipid nanoparticles based on multivalent peptide constructs.Journal of the American Chemical Society 2013,135(36),13414-24.

[0202] 23.Brouillette,C.G.;Jones,J.L.;Ng,T.C.;Kercret,H.;Chung,B.H.;Segrest, J.P.,Structural studies of apolipoprotein A-I/phosphatidylcholine recombinants by high-field proton NMR,nondenaturing gradient gel

electrophoresis, and electron microscopy. *Biochemistry* 1984, 23 (2), 359-67.

[0203] 24. Low, H.; Hoang, A.; Sviridov, D., Cholesterol efflux assay. *J Vis Exp* 2012, (61), e3810.

[0204] 25. Pandey, P.; Farha, O.K.; Spokoyny, A.M.; Mirkin, C.A.; Kanatzidis, M.G.; Hupp, J.T.; Nguyen, S.T., A "click-based" porous organic polymer from tetrahedral building blocks. *J Mater Chem* 2011, 21 (6), 1700-1703.

[0205] 26. Chan, Y.H.; van Lengerich, B.; Boxer, S.G., Lipid-anchored DNA mediates vesicle fusion as observed by lipid and content mixing. *Biointerphases* 2008, 3 (2), FA17.

[0206] 27. Hong, B.J.; Eryazici, I.; Bleher, R.; Thaner, R.V.; Mirkin, C.A.; Nguyen, S.T., Directed Assembly of Nucleic Acid-Based Polymeric Nanoparticles from Molecular Tetraivalent Cores. *Journal of the American Chemical Society* 2015, 137 (25), 8184-8191.

[0207] 28. Luthi, A.J.; Lyssenko, N.N.; Quach, D.; McMahon, K.M.; Millar, J.S.; Vickers, K.C.; Rader, D.J.; Phillips, M.C.; Mirkin, C.A.; Thaxton, C.S., Robust passive and active efflux of cellular cholesterol to a designer functional mimic of high density lipoprotein. *Journal of lipid research* 2015, 56 (5), 972-85.

[0208] 其他实施方案

[0209] 本说明书中公开的所有特征可以以任何组合进行组合。本说明书中公开的每个特征可以被用于相同、等效或类似目的的替代特征替换。因此，除非另有明确说明，所公开的每个特征仅是等效或相似特征的通用系列的实例。

[0210] 根据以上描述，本领域技术人员可以很容易地确定本发明的本质特征，并且在不脱离本发明的精神和范围的情况下，可以对本发明进行各种变化和修改以适应各种用途和条件。因此，其他实施方案也在权利要求的范围内。

[0211] 等同物

[0212] 虽然已在本文中描述和说明了几个本发明的实施方案，但本领域普通技术人员将容易地设想用于进行所述功能和/或获得本文所述的结果和/或一个或多个有利方面的各种其它方法和/或结构，并且这样的变化和/或修改的每一种被认为在本文所述的本发明的实施方案的范围内。更通常地，本领域技术人员将容易地理解，本文所述的所有参数、尺度、材料和构型意欲为示例性的并且实际参数、尺度、材料和/或构型将取决于对其使用本发明的教导的具体应用。本领域技术人员将认可或能够确定本文所述的特定的本发明的实施方案的许多等同物（通过使用不超过常规实验）。因此，应理解，前述实施方案仅通过举例的方式提出，并且在所附权利要求和其等同物的范围内，本发明的实施方案可按与明确描述和要求保护的方式不同的方式来实施。本公开内容的本发明的实施方案涉及本文所述的各种个体特性、系统、物品、材料、试剂盒和/或方法。另外，如果这样的特性、系统、物品、材料、试剂盒和/或方法不是相互矛盾的，则两个或更多个这样的特性、系统、物品、材料、试剂盒和/或方法的任意组合包括在本公开内容的发明范围内。

[0213] 如本文中定义和使用的，所有定义应当被理解为优先于词典定义、通过引用并入的文献中的定义和/或所定义的术语的一般含义。

[0214] 本文中公开的所有参考文献、专利和专利申请在关于引用其每一个的主题方面通过引用并入本文,这在一些情况下可包括文献的完整内容。

[0215] 除非明确地指示与之相反,否则不定冠词“一种/一个(a)”和“一种/一个(an)”,如本文中在说明书和权利要求中所用,应当被理解为意指“至少一种/一个”。

[0216] 短语“和/或”,如在本文中在说明书和权利要求中所用,应当被理解为意指所连接的元素的“任一个或两者”,即元素在一些情况下结合地存在以及在其它情况下分离地存在。利用“和/或”列出的多个元素应当以相同的方式来解释,即所连接的元素的“一个或多个”。除通过“和/或”从句明确确定的元素外,还可任选地存在其它元素,无论与明确确定的那些元素相关还是无关。因此,作为非限定性实例,对“A和/或B”的提及,当与开放性措辞诸如“包含/包括”结合使用时,在一个实施方案中可仅指A(任选地包括除B外的元素);在另一个实施方案中可仅指B(任选地包括除A外的元素);在另一个实施方案中,可指A和B(任选地包括其它元素);依此类推。

[0217] 如本文中在说明书和权利要求中所用,“或”应当被理解为具有与如上定义的“和/或”相同的含义。例如,当在列表中分开各项时,“或”或“和/或”应当被理解为是包含性的,即包含至少一个,但也包括许多个元素或一系列元素中的多于一个,以及任选地,包括另外未列出的项。只有明确地指明相反的术语,例如“……中的仅一个”或“……中的恰好一个”或当用于权利要求中时的“由……组成”将指包含多个元素或一系列元素中的正好一个元素。一般地,如本文中所用的术语“或”应当仅在冠有排他性的术语诸如“任一”、“……之一”、“……中的仅一个”或“……中的恰好一个”时被解释为表示排他性选择(即“一个或另一个但非两个”)。“基本上由……组成”,当用于权利要求中时,应当具有其在专利法领域中使用的普通含义。

[0218] 如本文中在说明书和权利要求中所用,关于一系列一个或多个元素的短语“至少一个”应当被理解为意指选自一系列元素中的任何一个或多个元素的至少一个元素,但不一定包括元素列表内明确列出的每一个元素的至少一个并且不排除元素列表中的元素的任何组合。该定义还允许可任选地存在除短语“至少一个”所指的元素列表内明确确定的元素外的元素,无论与那些明确确定的元素相关还是不相干。因此,作为非限定性实例,“A和B的至少一个”(或,等同地,“A或B的至少一个”或,等同地“A和/或B的至少一个”)可在一个实施方案中指至少一个(任选地包括不止一个)A而无B存在(且任选地包括除B外的元素);在另一个实施方案中指至少一个(任选地包括不止一个)B而无A存在(且任选地包括除A外的元素);在另一个实施方案中指至少一个(任选地包括不止一个)A和至少一个(任选地包括不止一个)B(且任选地包括其它元素);依此类推。

[0219] 还应当理解,除非明确地指明与之相反,否则在包括不止一个步骤或行为的本文请求保护的任何方法中,所述方法的步骤或行为的顺序不必须地限定于其中叙述所述方法的步骤或行为的顺序。

序列表

<110> Northwestern University

<120> 使用脂质缀合的核心支架的高密度脂蛋白模拟纳米颗粒

<130> N0491.70024W000

<140> Not Yet Assigned Yet

<141> Concurrently Herewith

<150> US 62/796,534

<151> 2019-01-24

<160> 2

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1

<211> 18

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成的多核苷酸

<400> 1

ttgttaatat gagtcgtt

18

<210> 2

<211> 18

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成的多核苷酸

<400> 2

aacgactcat attaacaa

18

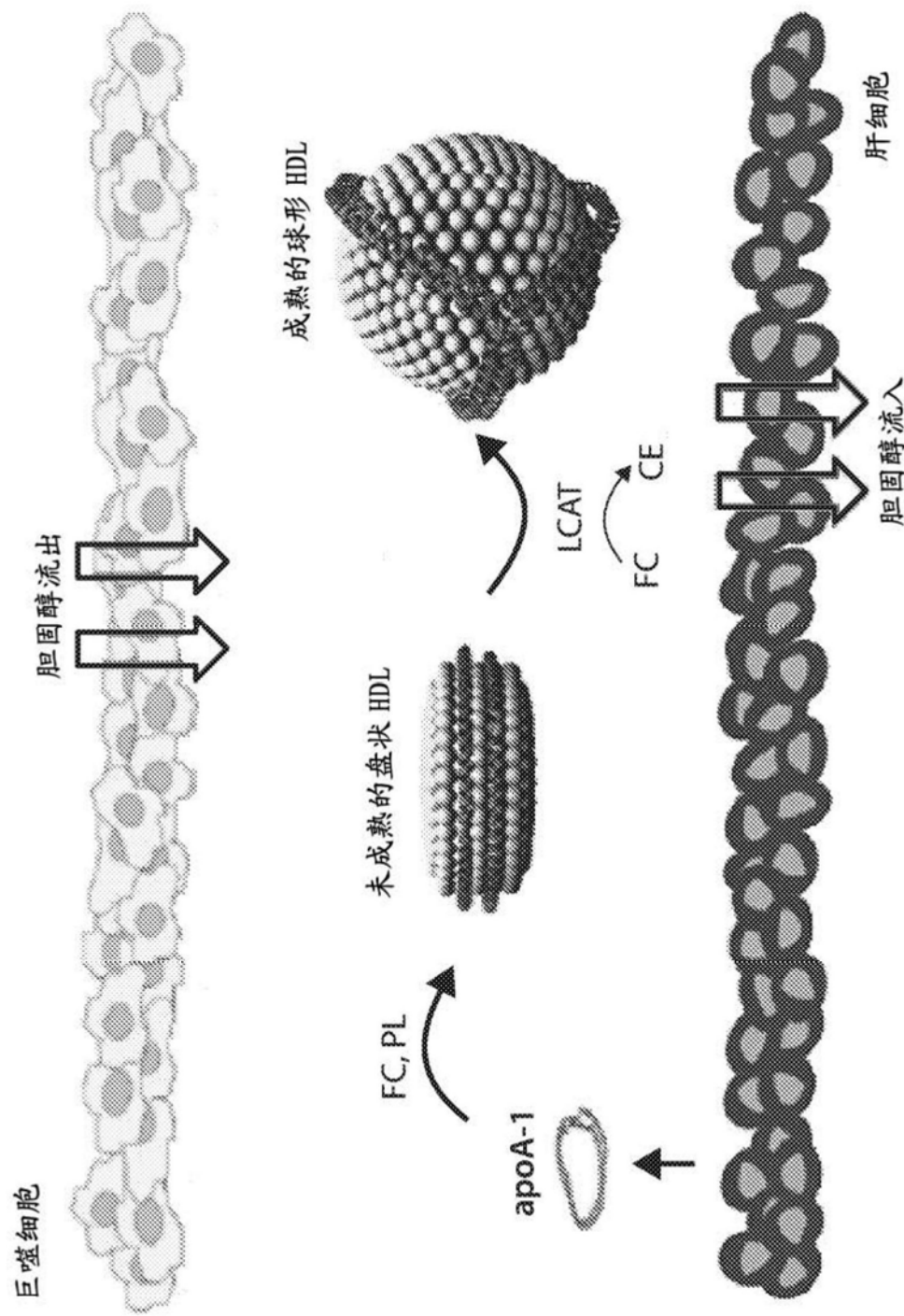


图1

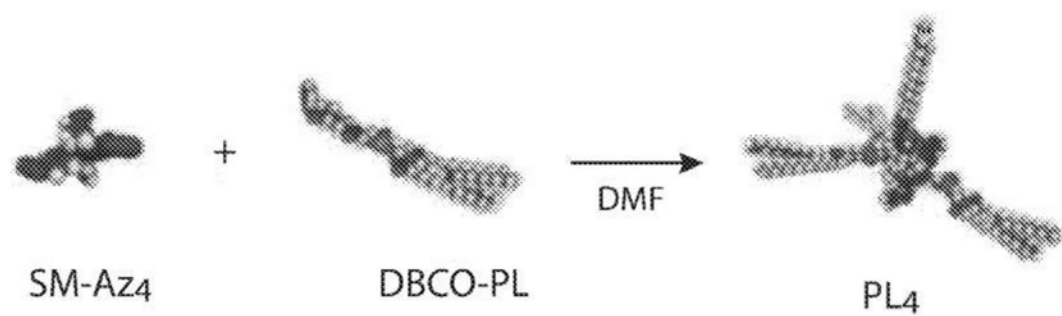


图2A

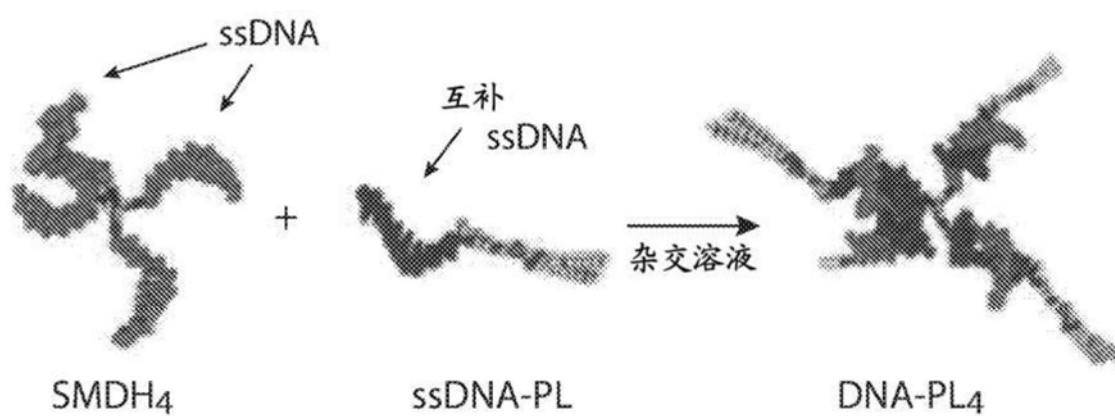


图2B

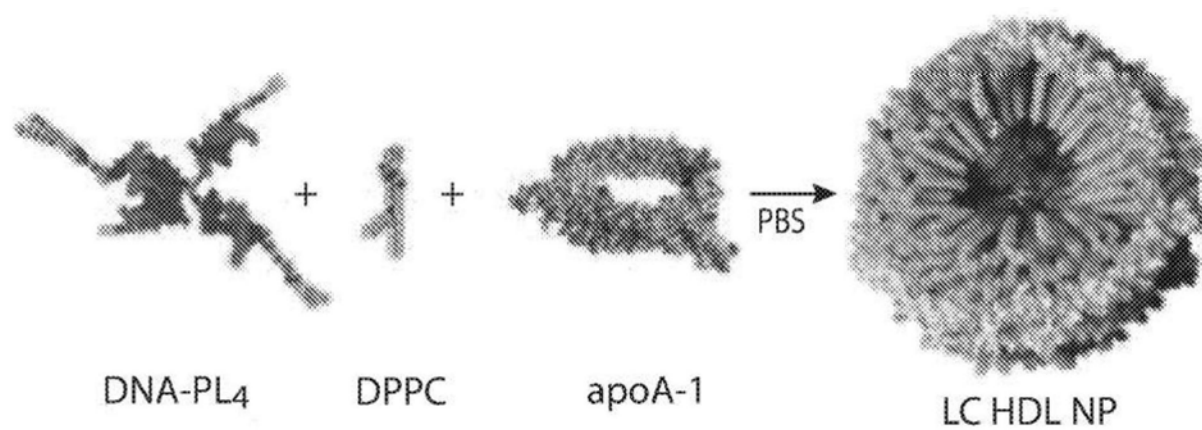


图2C

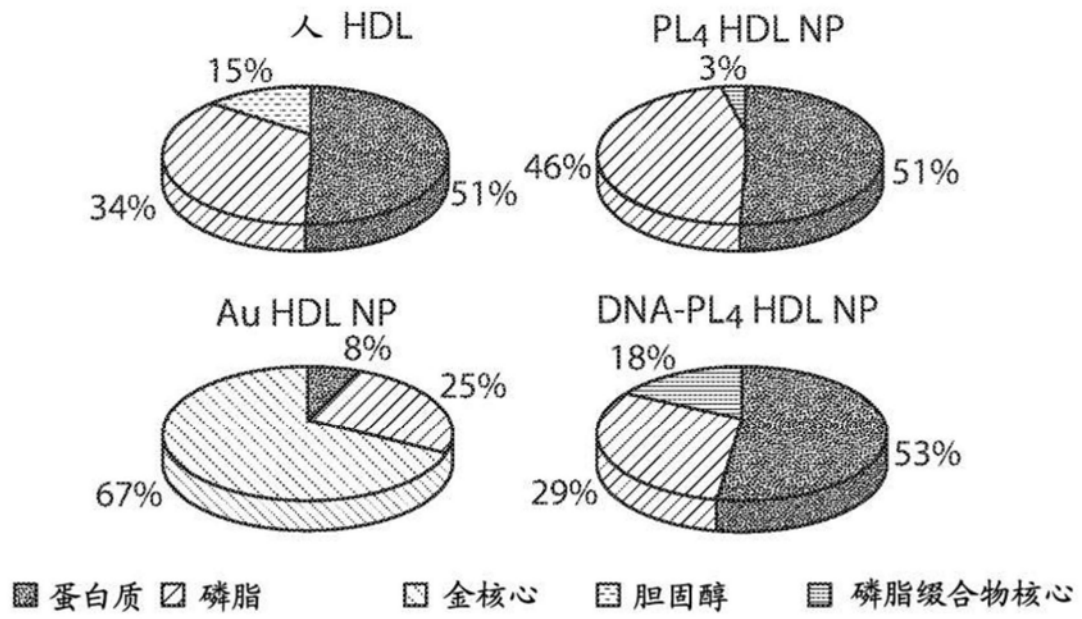


图2D

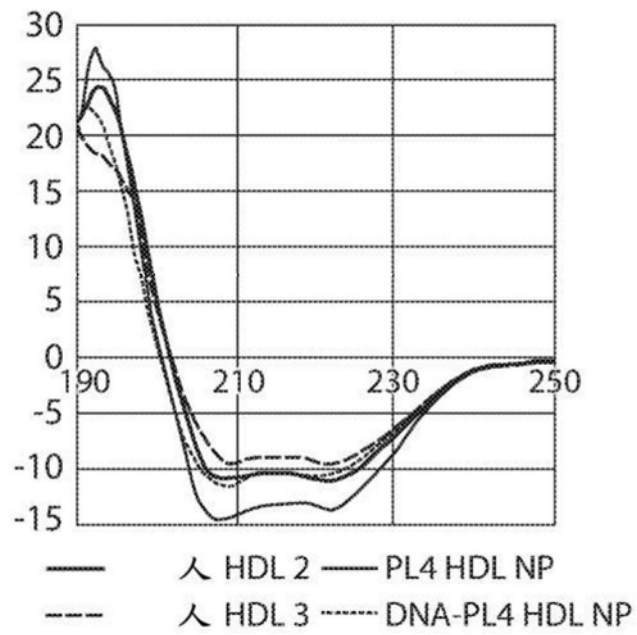


图2E

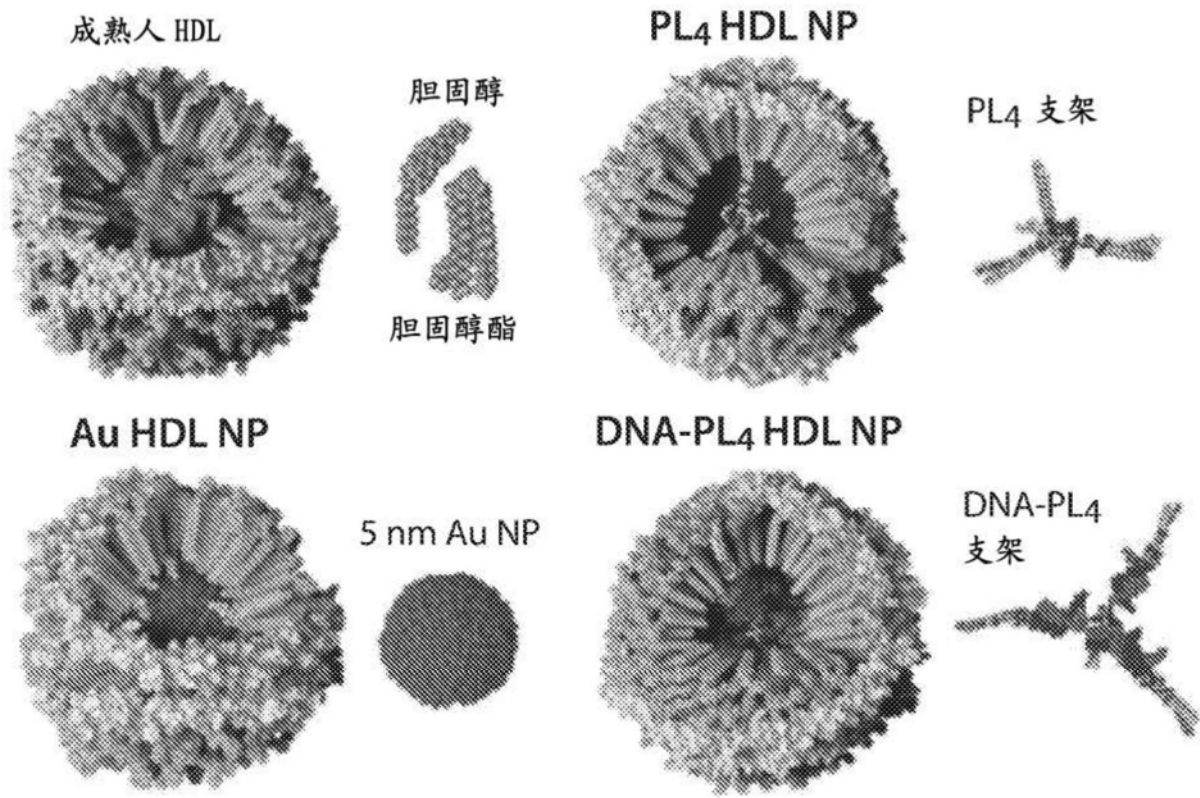


图2F

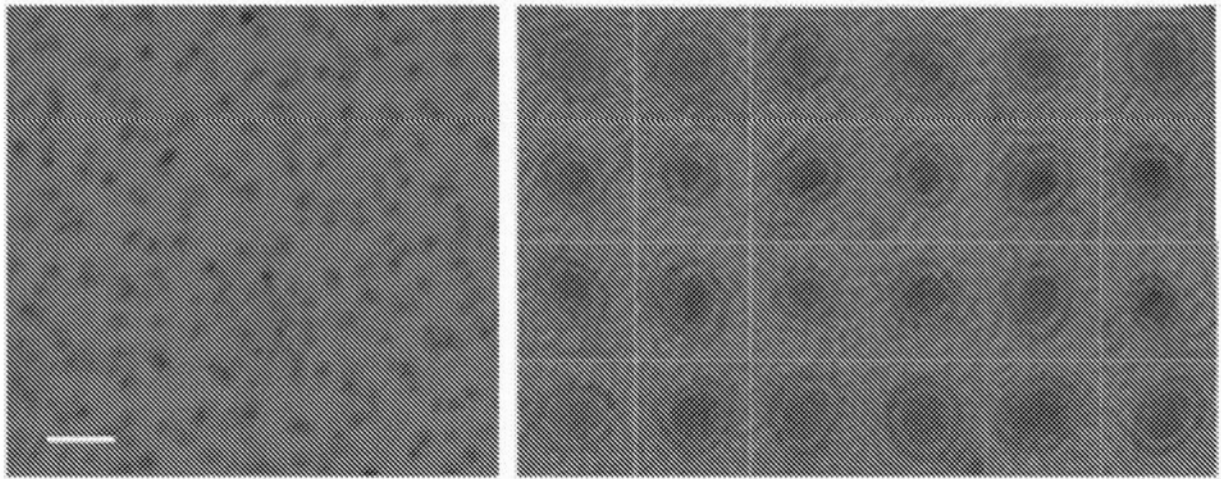


图2G

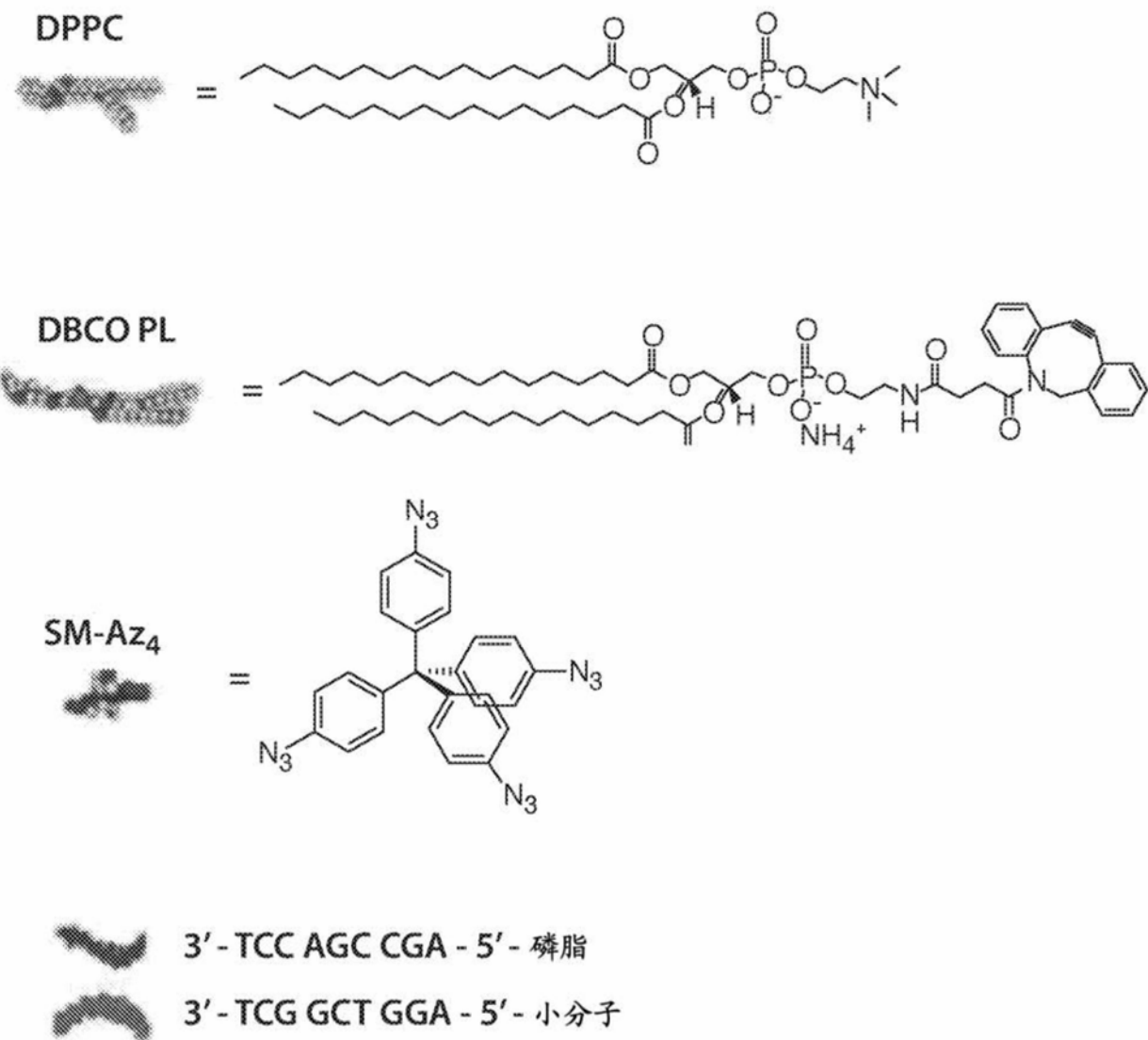


图2G续

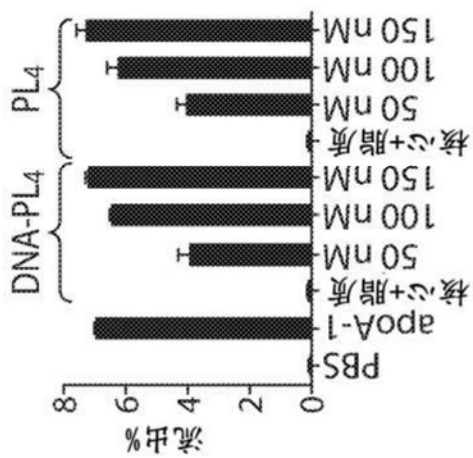


图3A

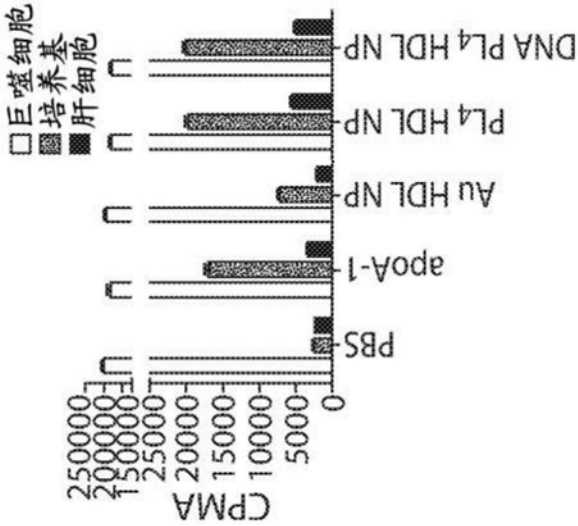


图3B

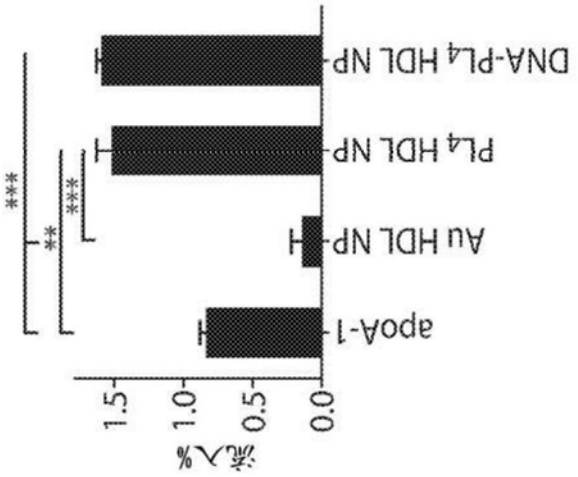


图3C

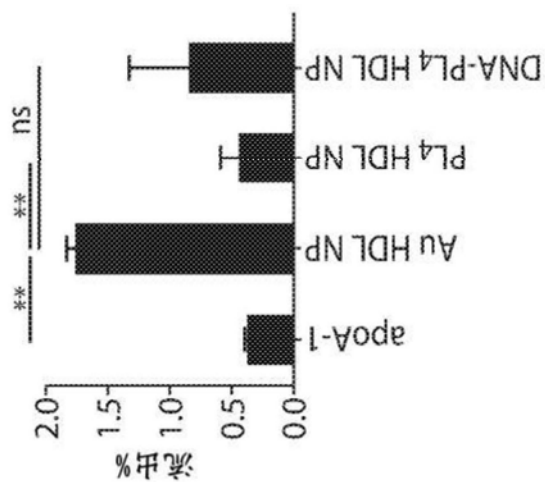


图3D

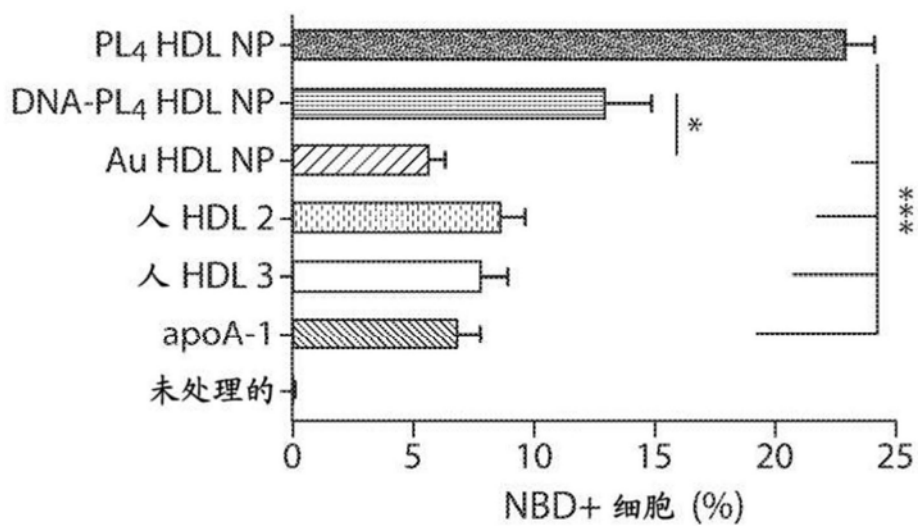


图4A

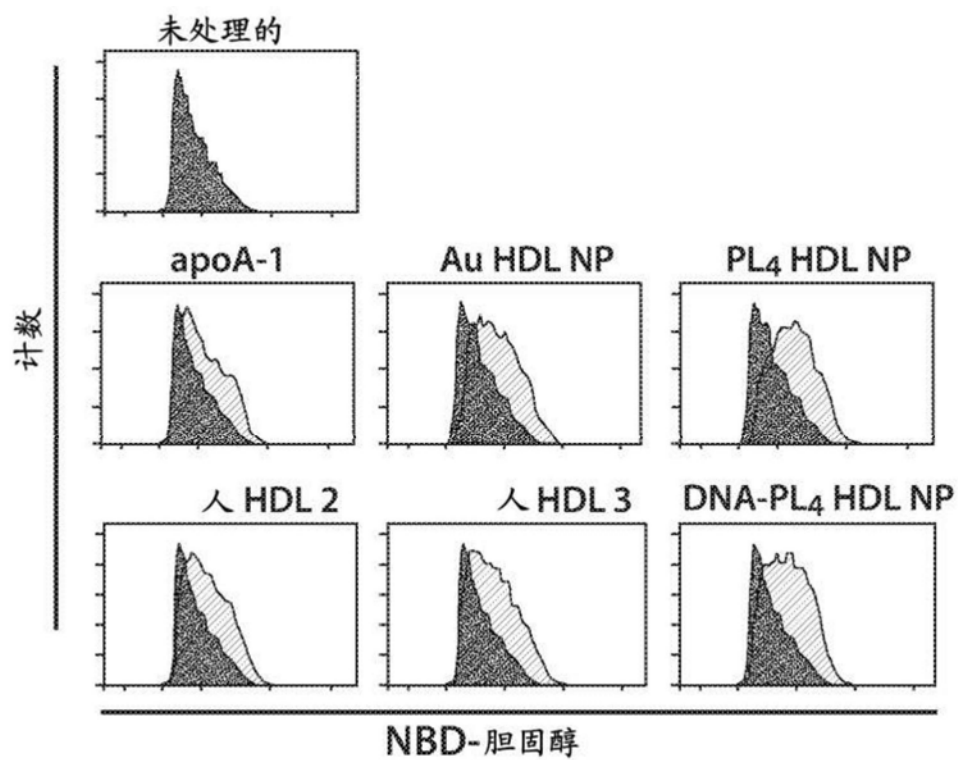


图4B

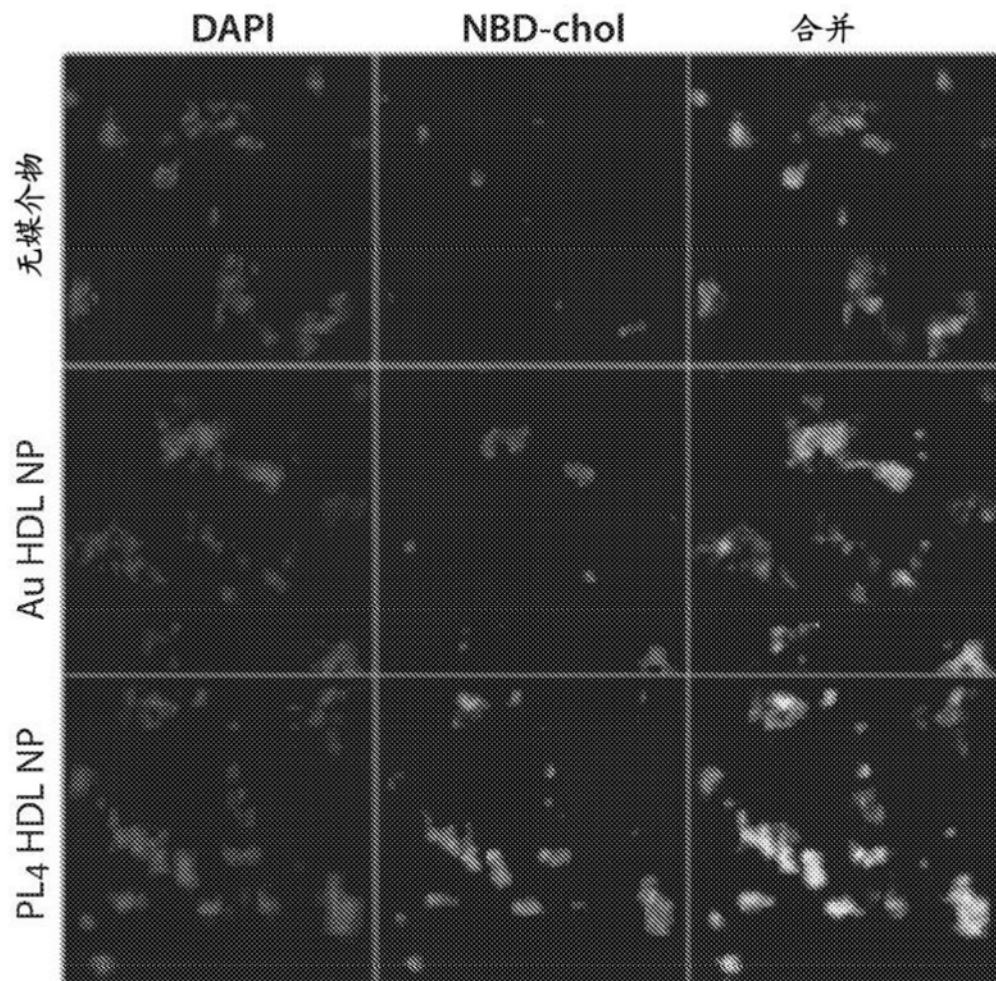


图4C

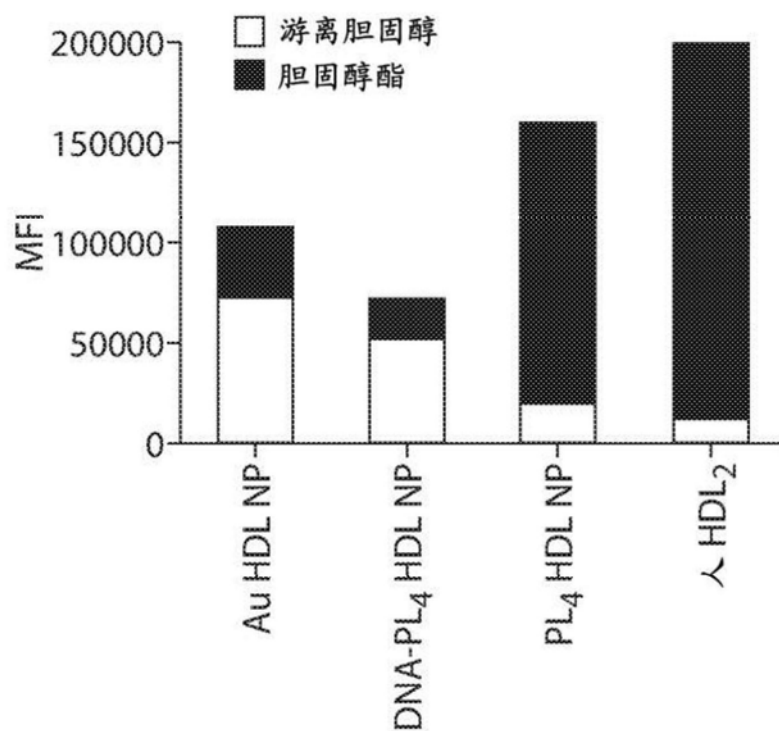


图5A

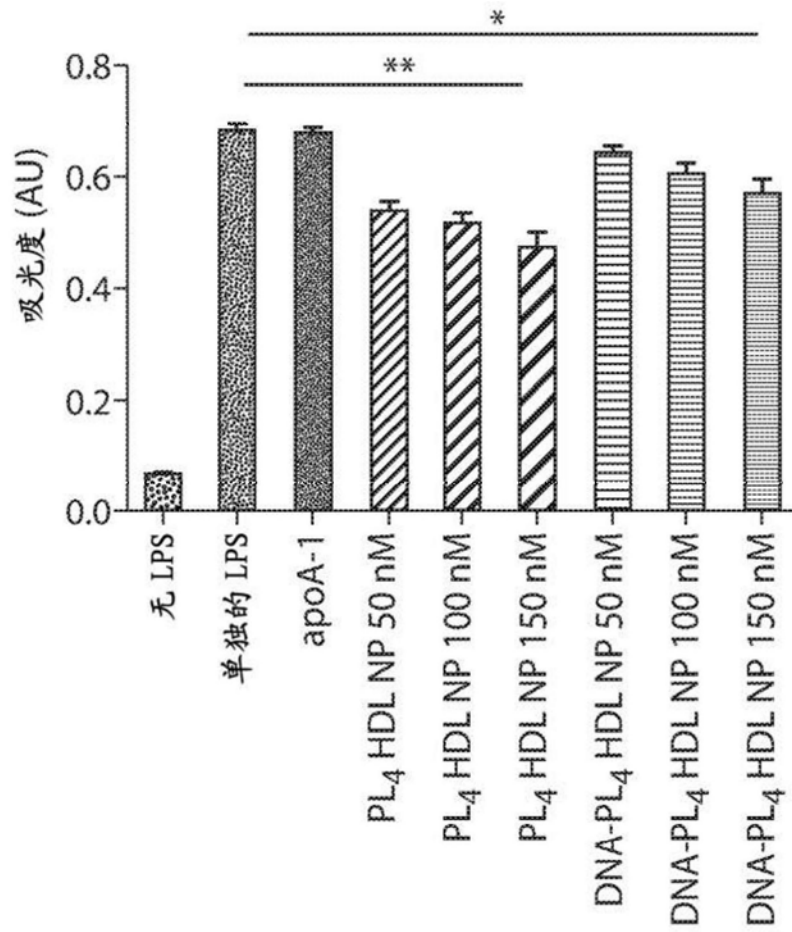


图5B

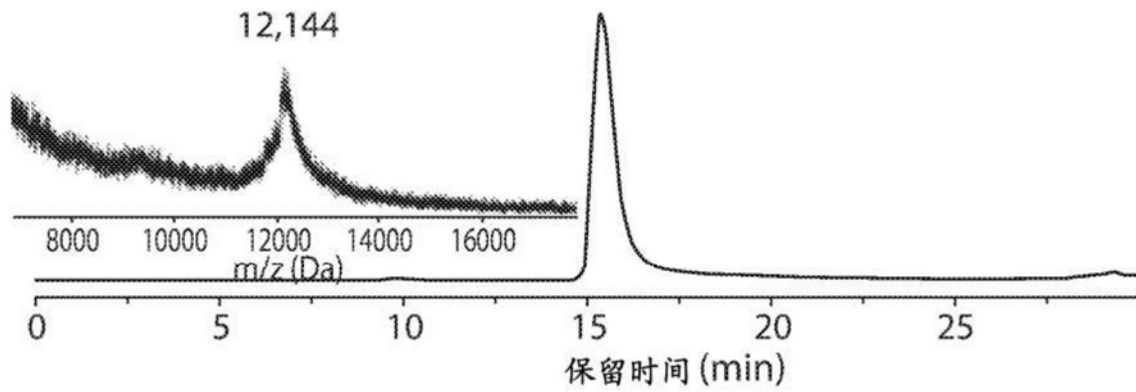


图6

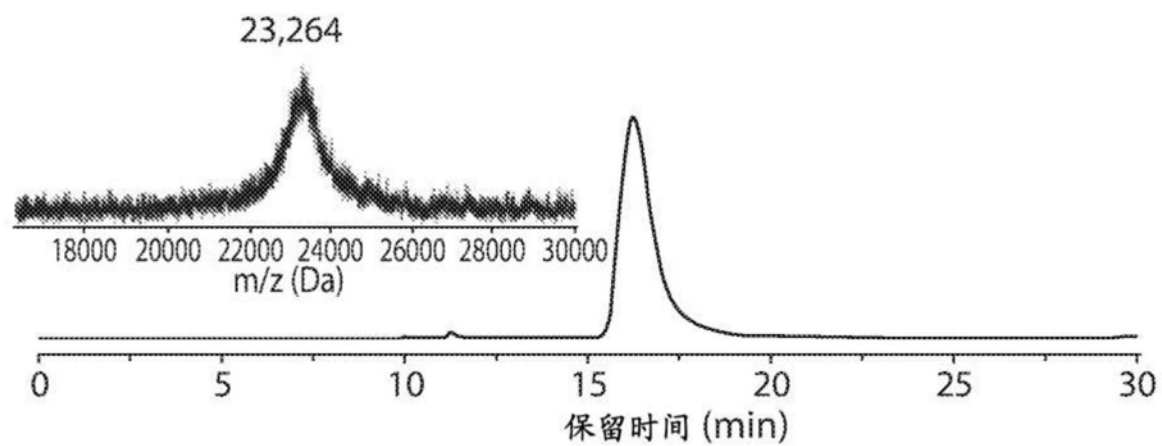


图7

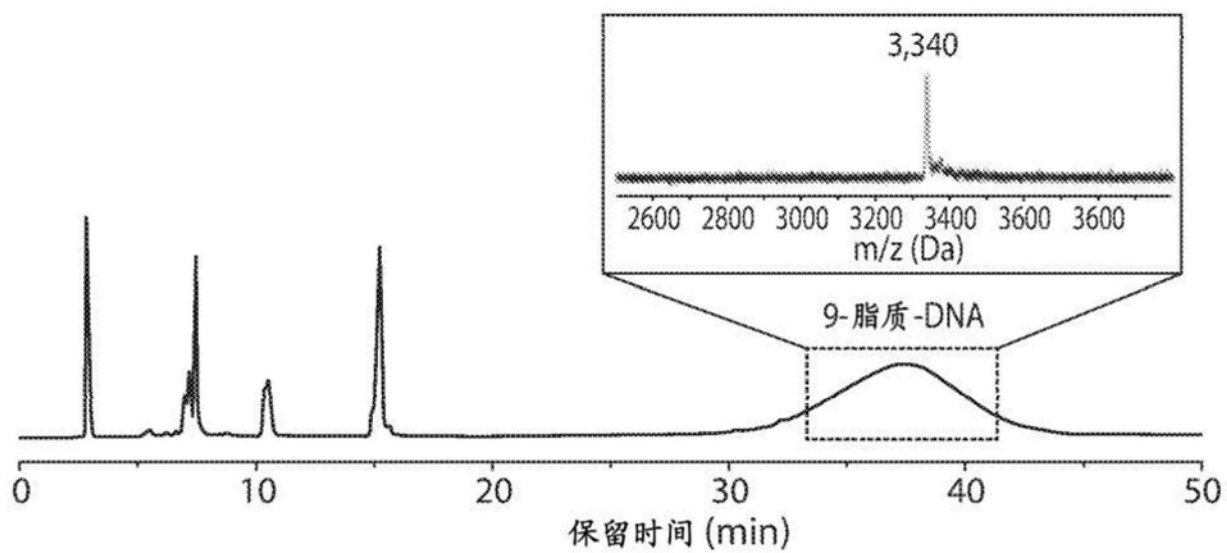


图8

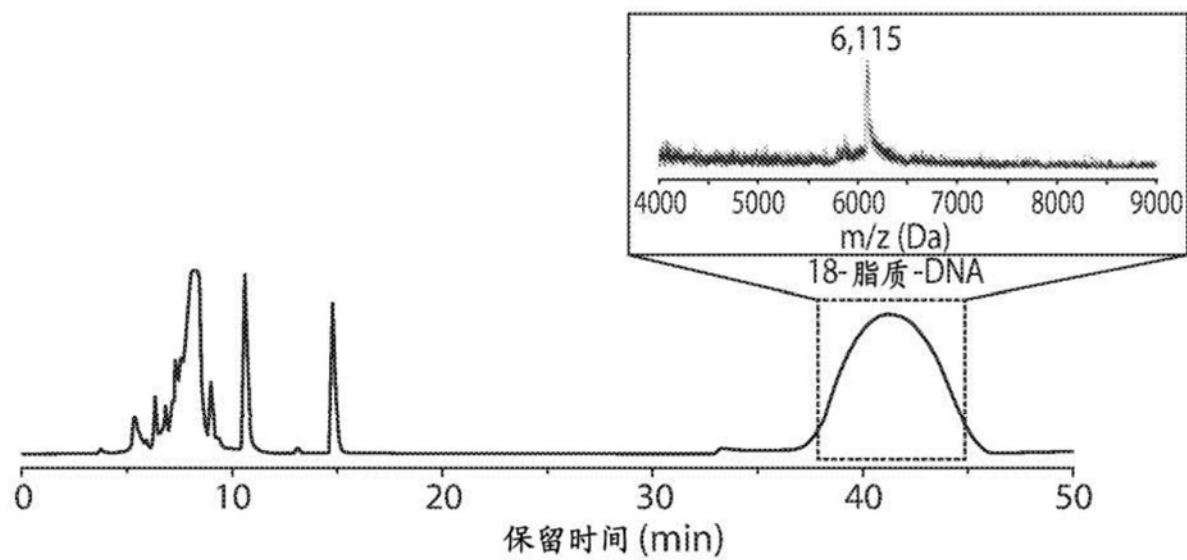


图9

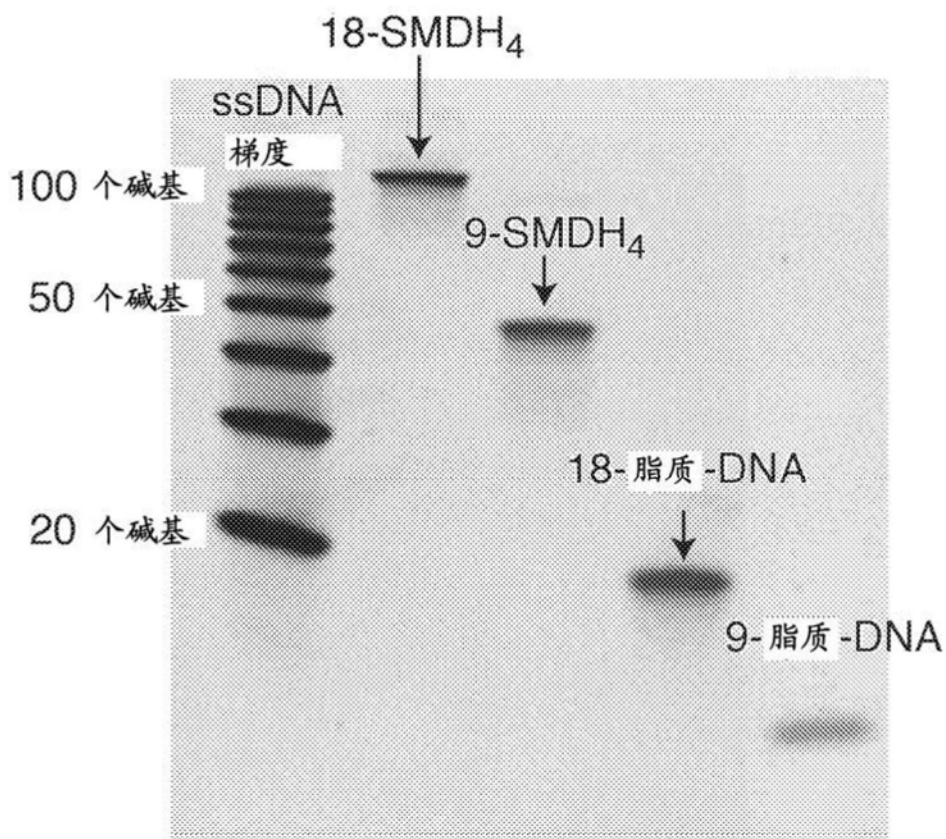
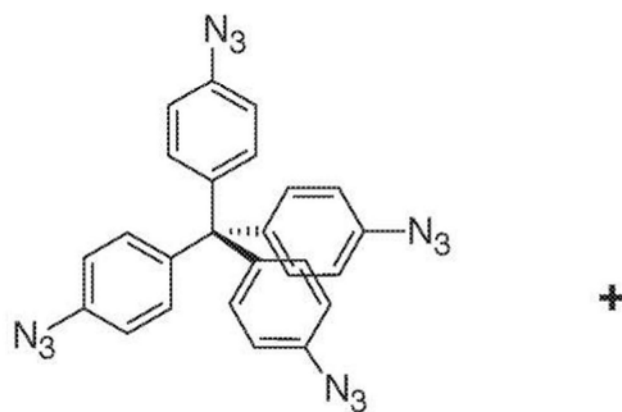
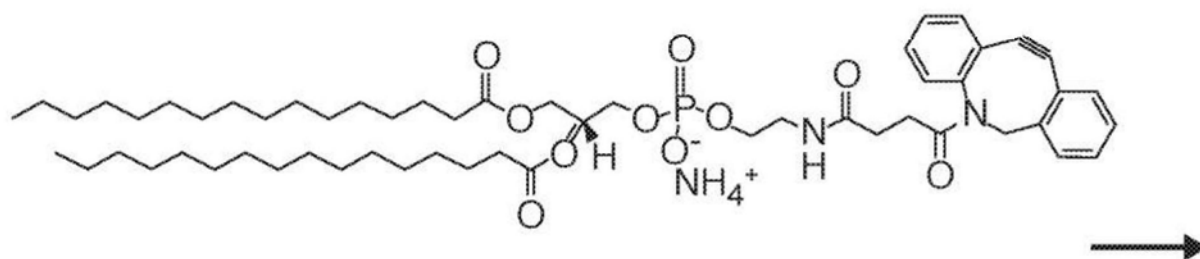


图10



四(4-叠氮苯基)甲烷
(SM-AZ₄)
MW = 484 g/mol



1, 2-二棕榈酰基-sn-甘油-3-磷酸乙醇胺-N-二苯并环辛基
(DBCO PL)
MW = 996 g/mol

图11

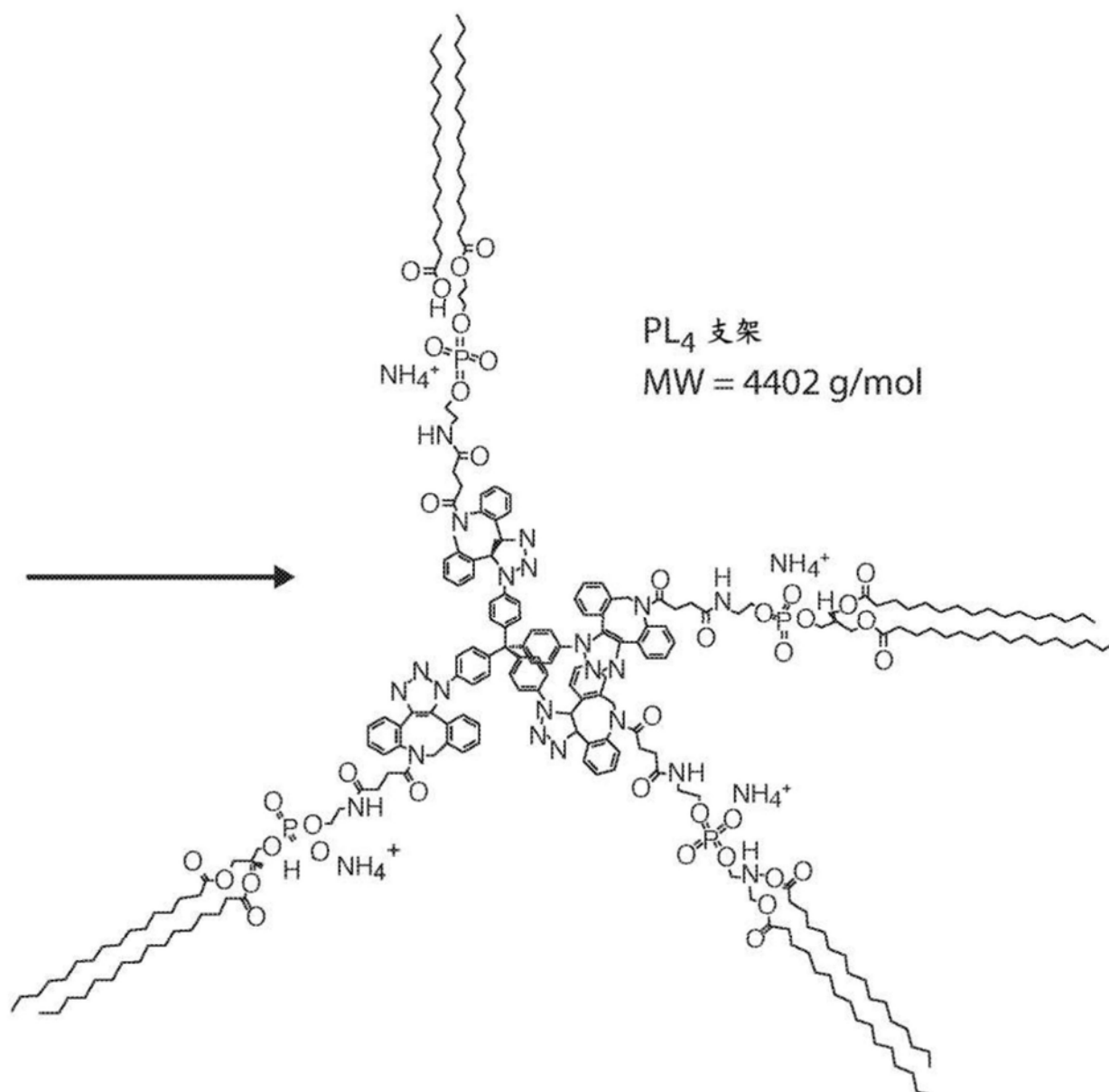


图11续

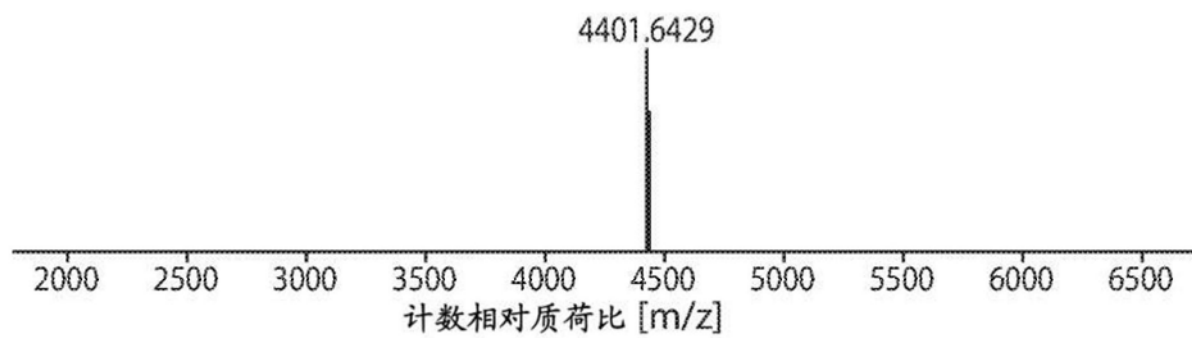


图12

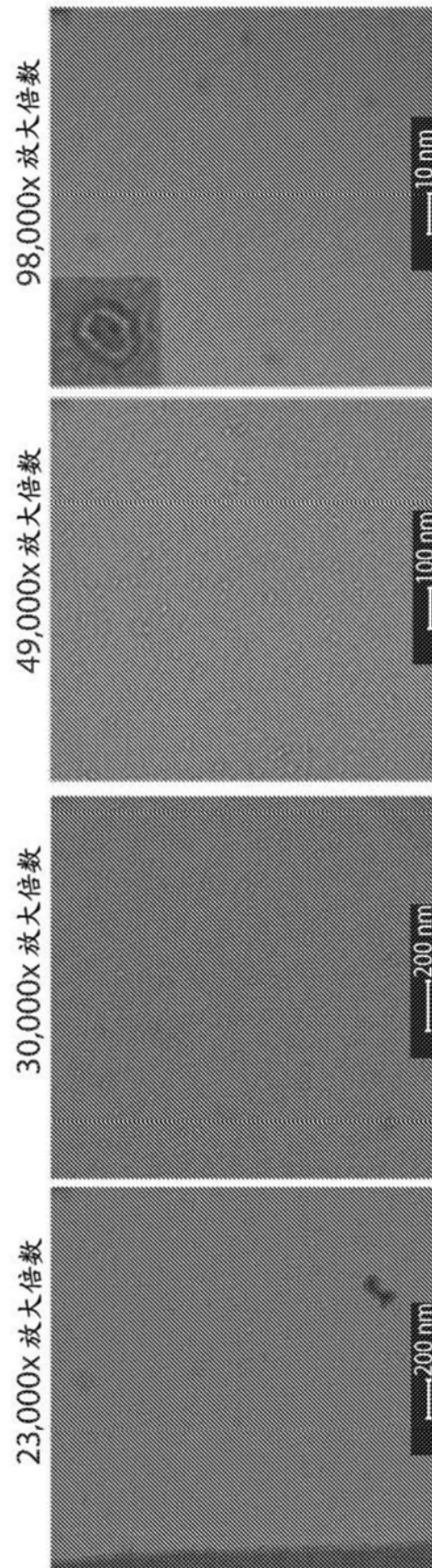


图13

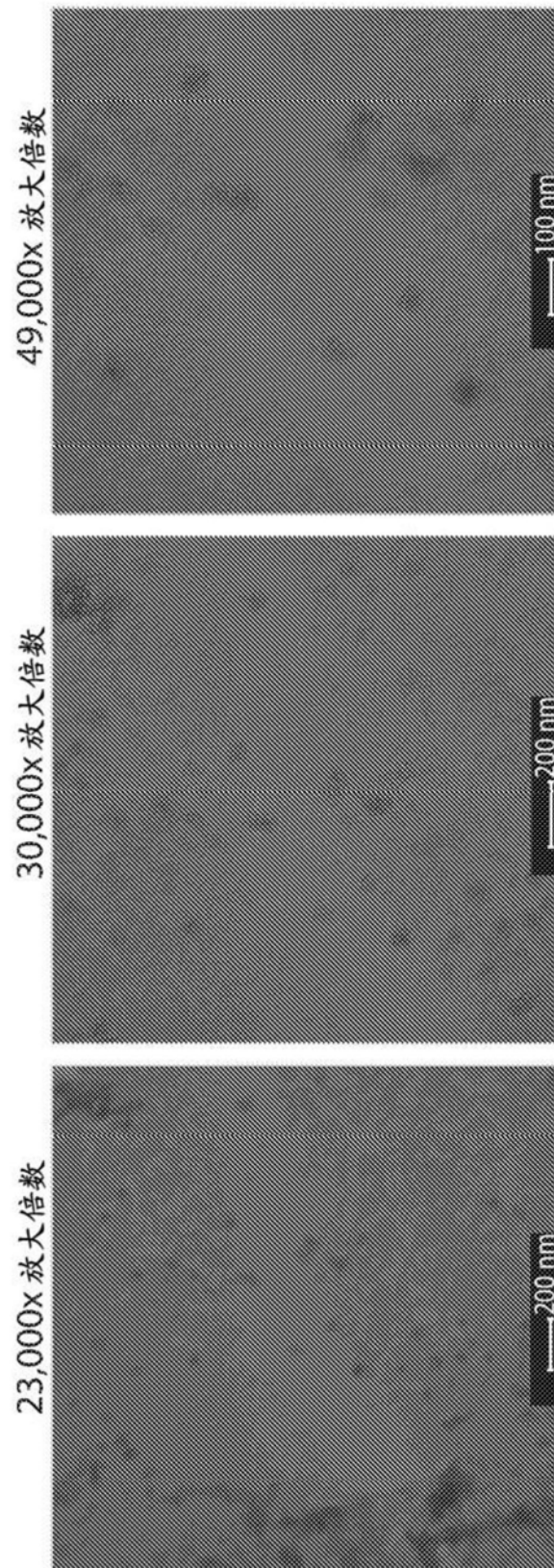


图14

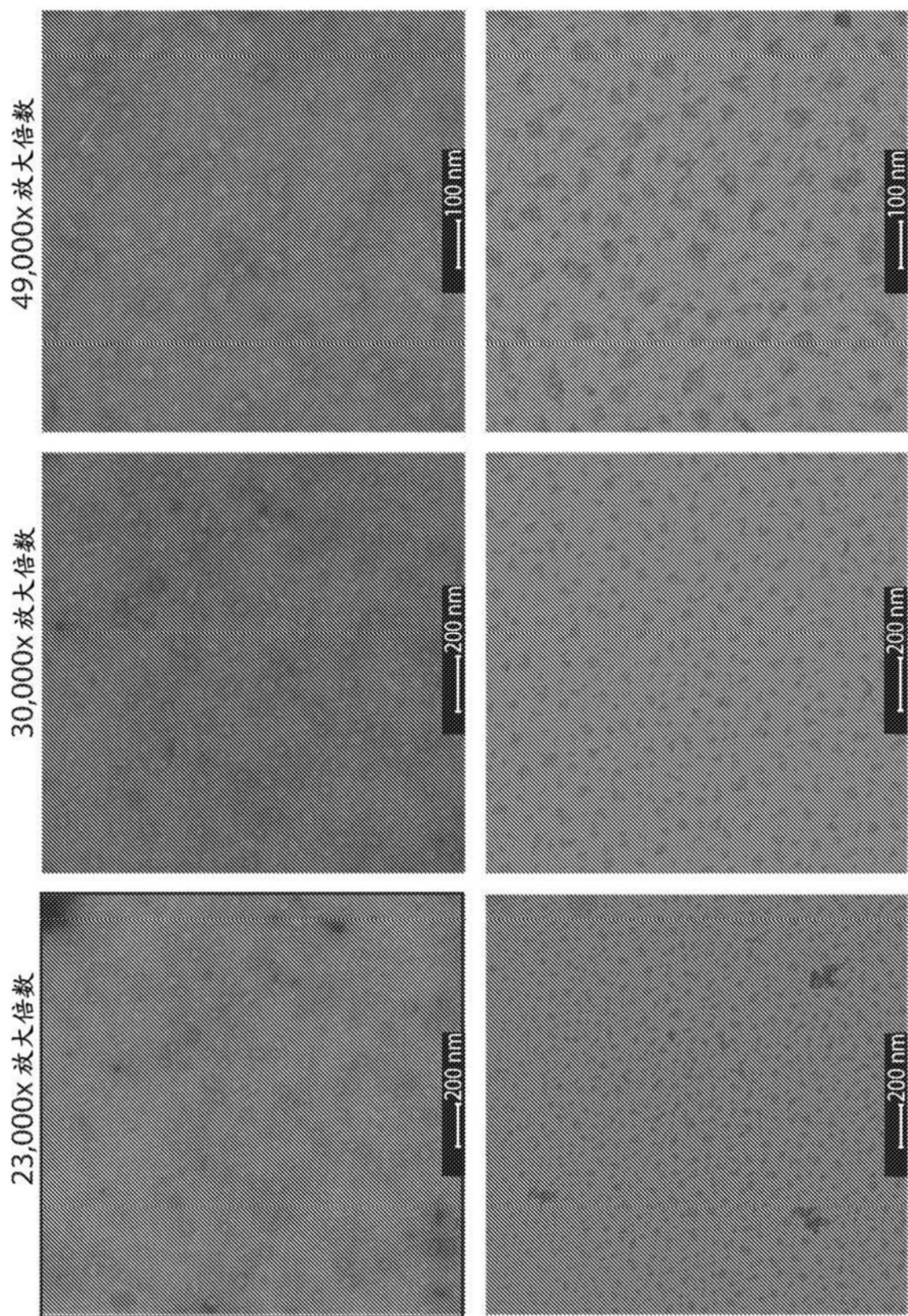


图15

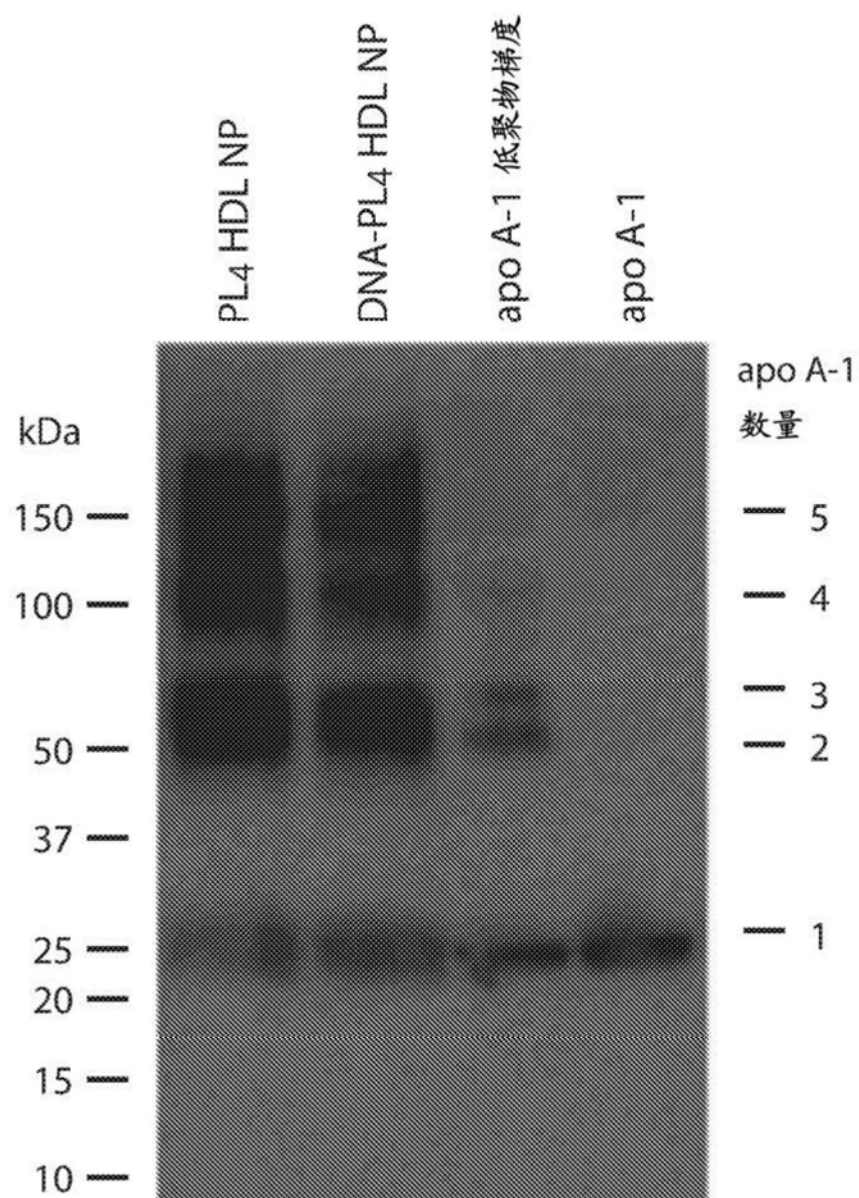


图16